

Selektiv væskefasemikroekstraksjon av angiotensin I, II og III i humant plasma

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND.PHARM.

Astrid Gjelstad



Kjemisk seksjon,
Farmasøytisk Institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Høsten 2004

Selektiv væskefasemikroekstraksjon av angiotensin I, II og III i humant plasma

Astrid Gjelstad

Hovedfagsoppgaven ble gjennomført ved avdeling for legemiddelanalyse, kjemisk seksjon, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo i perioden november 2003 til november 2004.

Veileder:

1.amanuensis dr. Leon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

FORORD

Jeg vil først og fremst takke 1.amanuensis dr. Leon Reubsaet for meget god veiledning og opplæring. Jeg har satt stor pris på dine gode råd, ditt store engasjement og at du alltid har vært tilgjengelig gjennom hele hovedfagsåret. Takk for at du har lært meg hvor interessant og spennende forskning kan være.

Videre vil jeg takke Håvard for meget godt samarbeid på laboratoriet og mange gode samtaler i løpet av året. Jeg vil dessuten rette en takk til Håvard og Sverre for et godt kontorfellesskap. Alle de andre på avdeling H fortjener også en stor takk for et sosialt og inkluderende miljø.

Jeg vil uttrykke min store takknemlighet ovenfor Bente, Kjersti, Linda, Anne og Karen som har bidratt til å gjøre studietiden så morsom og minnerik. Uten utallige luncher og kaffepauser med dere og deres gode humør hadde hverdagen vært atskillig kjedeligere. Dessuten vil jeg takke jentene i kollektivet for oppmuntrende ord og støtte når dagene har vært lange. Til slutt en stor takk til mamma og pappa for den store interessen dere har vist og inspirasjonen dere har vært for meg gjennom hele studiet.

Oslo, november 2004

Astrid Gjelstad

INNHALDSFORTEGNELSE

1	SAMMENDRAG	5
2	FORKORTELSER.....	6
3	INNLEDNING	8
3.1	BAKGRUNN	8
3.2	HENSIKT	9
4	TEORI.....	10
4.1	PEPTIDER	10
4.2	ANGIOTENSINER	11
4.2.1	<i>Historie.....</i>	<i>11</i>
4.2.2	<i>Angiotensinenes fysiologi.....</i>	<i>11</i>
4.2.3	<i>Angiotensinenes struktur og kjemi</i>	<i>13</i>
4.3	VÆSKEFASEMIKROEKSTRAKSJON, LPME.....	16
4.3.1	<i>LPME av peptider</i>	<i>18</i>
4.4	VÆSKEKROMATOGRAFI, HPLC	19
4.5	LC-MS	21
4.6	PLASMA OG PROTEINFELLING	23
5	MATERIALER OG METODER.....	25
5.1	KJEMIKALIER OG UTSTYR	25
5.2	PRØVEOPPARBEIDELSE	28
5.3	HPLC	29
5.4	LC-MS	30
5.5	LPME I VANN.....	31
5.5.1	<i>Tillaging av peptidløsninger</i>	<i>31</i>
5.5.2	<i>Donorvolum.....</i>	<i>31</i>
5.5.3	<i>pH i donor</i>	<i>32</i>
5.5.4	<i>Konsentrasjon av heptansulfonsyre i donorfasen.....</i>	<i>35</i>
5.5.5	<i>Dibutylfosfat som ionpardanner.....</i>	<i>36</i>
5.5.6	<i>pH i akseptorfase.....</i>	<i>37</i>
5.5.7	<i>Organisk fase</i>	<i>38</i>
5.6	PLASMA	39
5.6.1	<i>Innledende forsøk.....</i>	<i>39</i>
5.6.2	<i>Proteinfellingsreagenser</i>	<i>41</i>
5.6.3	<i>LPME i plasma.....</i>	<i>45</i>
5.6.4	<i>LPME i plasma med LC-MS-analyse</i>	<i>47</i>
5.7	VALIDERING	49
5.7.1	<i>Stabilitet</i>	<i>49</i>

5.7.2	<i>Linearitet</i>	49
5.7.3	<i>Repeterbarhet</i>	49
5.8	BEREGNING AV OPPKONSENTRERINGSFAKTOR OG UTBYTTE.....	50
6	RESULTATER OG DISKUSJON	51
6.1	HPLC- OG LC-MS-METODE.....	51
6.2	VALIDERING.....	55
6.2.1	<i>Stabilitet</i>	55
6.2.2	<i>Linearitet</i>	56
6.2.3	<i>Relativt standardavvik</i>	59
6.3	LPME I VANN.....	60
6.3.1	<i>Volum av donorfase</i>	60
6.3.2	<i>Ionpaddanner</i>	62
6.3.3	<i>Variasjoner i pH i donorfase</i>	65
6.3.4	<i>pH i akseptorfase</i>	67
6.3.5	<i>Organisk fase</i>	70
6.4	PLASMA.....	71
6.4.1	<i>Innledende forsøk</i>	71
6.4.2	<i>Proteinfellingsreagenser</i>	72
6.4.3	<i>LPME i plasma</i>	74
6.4.4	<i>LPME i plasma med LC-MS-analyse</i>	79
7	KONKLUSJON	83
8	REFERANSELISTE	84

1 SAMMENDRAG

Den relativt nye prøveopparbeidelsesteknikken trefase væskefasemikroekstraksjon (LPME) ble prøvd ut som ekstraksjonsmetode for angiotensin I, II og III i kombinasjon med HPLC-UV og LC-MS. I peptidanalyse kombinert med LPME er det til nå bare kjent metoder for ekstraksjon av små modellpeptider i vann. Ekstraksjonsbetingelsene for angiotensinene ble optimalisert i vann og i humant plasma. Det ble også utviklet separasjonsbetingelser for angiotensiner i HPLC og LC-MS.

Peptidene ble ekstrahert fra vann eller plasma gjennom en porøs hulfiber impregnert med et organisk løsningsmiddel og over i en vandig, sur akseptorfase i fiberens hulrom. Forholdene i donorfasen og i akseptorfasen ble optimalisert slik at peptidenes vandring over den organiske membranen ble forbedret. Det ble særlig fokusert på pH i akseptorfase og donorfase slik at ny kunnskap om transporten av peptidene mellom de tre fasene kunne genereres. Optimal pH for ekstraksjonen ble funnet å være pH~1 i akseptor og pH~3 i donor. Det ble bekreftet at transporten er avhengig av en ionpardanner som danner hydrofobe komplekser med angiotensinene slik at disse blir hydrofobe nok til å diffundere inn i den organiske fasen. 1-heptansulfonsyre ble foretrukket som ionpardanner til kompleksdannelse med angiotensinene. *n*-oktanol ble benyttet som organisk fase. Beregnede utbytter ved LPME av peptidene under disse optimale forholdene var mellom ca 50 % (angiotensin II) og 80 % (angiotensin III). RSD lå i underkant av 10 % i disse ekstraksjonene.

Den optimaliserte metoden i vann ble overført til humant plasma. Peptidene ble ekstrahert fra plasma etter proteinfelling, pH-justering og tilsetning av ionpardanner. Det ble oppnådd utbytte på rundt 20 % for alle angiotensiner ved tilsetning av peptid før proteinfelling, og mellom 37 (angiotensin II) og 59 % (angiotensin III) ved tilsetning av peptid til supernatanten etter felling.

Akseptorfasene etter LPME i plasma ble også analysert på LC-MS, hvor en konsentrasjon av angiotensin II på 5 ng/ml i plasma var detekterbar.

2 FORKORTELSER

ACN	Acetonitril
CH ₃ COOH	Eddiksyre
CH ₃ COONa	Natriumacetat
C ₇ SO ₃ ⁻	1-Heptansulfonsyre
dBp	Dibutylfosfat
HCl	Saltsyre
HCOOH	Maursyre
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenfosfat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenfosfat
NaOH	Natriumhydroksid
TCA	Triklorreddiksyre
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	Sinksulfat heptahydrat
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Ang III	Angiotensin III
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
Gly	Glysin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Phe	Fenylalanin
Pro	Prolin
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
LPME	Liquid Phase Micro Extraction (Væskefasemikroekstraksjon)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Væsekromatografi)
UV	Ultrafiolett
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
TIC	Total Ion Current

SIM	Selective Ion Monitoring
ESI	Electrospray Ionization
rpm	Rotasjoner per minutt
i.d.	Indre diameter
p.a.	Pro analysis
SLM	Supported Liquid Membrane
<i>pI</i>	Isoelektrisk punkt
μl	Mikroliter
μg	Mikrogram
ng	Nanogram
pg	Pikogram
mM	Millimolar
RSD	Relativt standardavvik

3 INNLEDNING

3.1 Bakgrunn

Selektiv prøveoppbeidelse og analyse av endogene peptider er et meget interessant og viktig felt i fremtidens medisinske forskning. Det er stadig økende fokus på biologisk aktive peptider som biomarkører for patologiske tilstander, og dette vil samtidig kreve utvikling av nye, avanserte analysemetoder. Farmasøytisk industri har også vist interesse for dette området med tanke på peptidmapping for å bestemme strukturen til terapeutiske proteiner [1].

Biologisk aktive peptider fungerer ofte som signalmolekyler i kroppen. Hver substans utøver sin rolle i et stort, komplisert samspill som er avhengig av at hvert molekyl utfører sin oppgave på riktig måte. Vekst og metabolsk stimulans er eksempler på prosesser som er betinget av korrekt signaloverføring. Dersom det blir ubalanse i slike systemer kan det føre til sykdom hos individet, og en selektiv analysemetode vil kunne detektere en slik ubalanse og muligens diagnostisere tilstanden. Konsentrasjonen av slike markører i biologiske matrikser er imidlertid meget lav og ligger ofte på nivået pg/ml. Det vil derfor kreves svært følsomme prøveoppbeidelses- og analysemetoder for å kunne detektere endogene peptider.

Det er kjent flere metoder for prøveoppbeidelse av peptider fra biologiske væsker [2, 3]. Slike metoder er imidlertid vanligvis tidkrevende og lite selektive, i tillegg til at de har små muligheter for oppkonsentrering. Flere av forsøkene fokuserer på peptidenes vandring over forskjellige barrierer som oppstår i et ekstraksjonsmiljø. For å kunne ekstrahere peptider ut av en biologisk væske, er det nærliggende å prøve å simulere naturlige biologiske barrierer som biomarkører må passere i kroppen. Dette vil gi et bedre innblikk i peptidenes atferd og i reaksjonsmekanismen til peptidenes vandring over hydrofobe membraner. Supported liquid membrane (SLM) er et trefasesystem hvor en organisk fase skiller to vandige løsninger [4-6]. I denne teknikken har "crown ethers" [7-9], D2EPA [10-13], sykliske karboksylderivater [14] og karboksylert polystyren [15] blitt benyttet som ionpardanner i forbindelse med prøveoppbeidelse. Vandringer til ulike aminosyrer som Phe [10, 13-16], Trp [10, 14], Ala [16], Tyr [14], Asp og Glu [10] er studert ved bruk av SLM. Disse metodene krever store væskevolum i forhold til væskefasemikroekstraksjon (LPME).

LPME og væskechromatografi (HPLC) vil være sentrale redskaper i utvikling av nye analysemetoder. LPME har vist lovende resultater i prøveopparbeidelse av hydrofile legemidler fra biologiske væsker [17-20] og små modellpeptider i vann [21]. Ved trefase LPME blir analyttene ekstrahert fra en prøve gjennom en porøs hulfiber impregnert med en organisk fase og over i en vandig akseptorfase som er introdusert i fiberens hulrom. Stor forskjell i volum mellom prøveløsning (0,5-4 ml) og akseptorfase (20 µl) fører til at oppkonsentreringsevnen til metoden blir stor. HPLC-UV er velegnet til analyse etter LPME fordi systemet er nøyaktig og presist. Det er imidlertid ikke følsomt nok til å kunne detektere endogene konsentrasjoner av peptider, og LC-MS vil derfor være en bedre egnet detektor til lave peptidkonsentrasjoner.

LPME har ikke tidligere blitt benyttet til ekstraksjon av peptider på størrelse med angiotensiner, og det finnes derfor ingen kunnskap om hvordan peptider med 7-10 aminosyrer oppfører seg i et LPME-system. Det store potensialet denne teknikken har til oppkonsentrering og selektivisering gjør at den i kombinasjon med LC-MS er meget interessant med tanke på deteksjon av endogene peptider i biologiske matrikser, selv i lave konsentrasjoner (pg/ml).

3.2 Hensikt

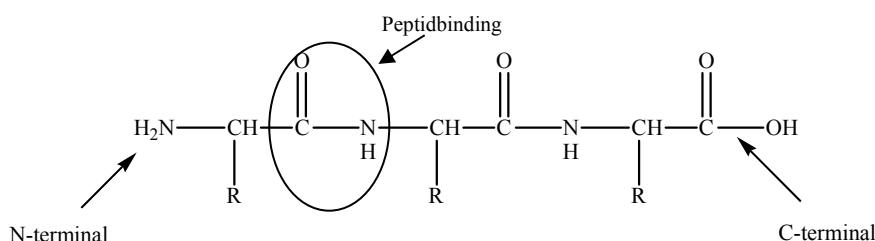
Det overordnede målet med dette arbeidet vil være å utvikle en selektiv metode for opprensning av angiotensin I, II og III fra humant plasma. Før metoden kan optimaliseres i plasma må imidlertid angiotensinenes oppførsel i et LPME-system i vann kartlegges. På bakgrunn av dette vil også dypere kunnskap om peptiders oppførsel generelt i LPME stå som et sentralt punkt. Trefase LPME vil bli benyttet som prøveopparbeidelsesteknikk, hvor endring av betingelser i de tre fasene vil stå i fokus. Det legges først vekt på å optimalisere metoden i vann slik at høyest mulig utbytte kan oppnås. Dessuten vil utvikling av metoder for analyse av peptidene på HPLC-UV og LC-MS være et viktig delmål. Det skal utføres en delvis validering av metoden ved å bestemme stabilitet av peptidene, linearitet og repeterbarhet.

4 TEORI

4.1 Peptider

Peptider er polymerer av aminosyrer, og kan variere i størrelse fra små molekyler med to eller tre aminosyrer til polypeptider som kan bestå av inntil hundre aminosyrer. Det finnes 20 ulike aminosyrer, og alle bortsett fra prolin kalles α -aminosyrer. De har en primær aminogruppe og en primær karboksylgruppe som er bundet til samme karbonatom, α -karbonatomet. I peptider er aminosyrene bundet sammen via peptidbindinger som lenker α -karboksylgruppen på den ene aminosyren sammen med α -aminogruppen på den andre (figur 4-1). Alle aminosyrene er ulike med hensyn til syre-base egenskaper og hydrofobisitet, og hver aminosyre har sin pK-verdi for α -karboksylgruppe, α -aminogruppe og sidekjede. pK_a-verdiene til α -karboksylgruppene ligger mellom 1,8 og 2,4 mens α -aminogruppen hos de fleste aminosyrene har en pK-verdi som ligger mellom 8,2 og 11. Aminosyrene kan sees på som bokstavene i et alfabet som kan kombineres på mange ulike måter, derfor finnes det utallige forskjellige peptider.

Peptider kan skilles fra hverandre på grunnlag av deres forskjellige ionisering. Peptidene inneholder kun en fri α -aminogruppe, N-terminalen, og en fri α -karboksylgruppe som betegnes C-terminalen (figur 4-1). Disse gruppene ioniseres på lik linje med enkle aminosyrer, og virker inn på syre-baseegenskapene. pK-verdien til N-terminalen og C-terminalen på et peptid er imidlertid litt forskjellig fra de enkle aminosyrene fordi den motsatt ladede gruppen ikke sitter på samme α -karbonatom. De andre α -karboksylgruppene og α -aminogruppene i peptidet vil inngå i peptidbindingen og derfor være uionisert og uten påvirkning av syre-baseegenskapene. Sidekjedene (R) i enkelte aminosyrer kan derimot ioniseres, og disse vil bidra i forhold til peptidets syre-baseegenskaper. Hvert peptid har derfor karakteristiske titreringskurver og et isoelektrisk punkt (pI), pH-verdien hvor peptidets nettoladning er null [22].



Figur 4-1: Generell peptidstruktur

Sidekjedene i et peptid bestemmer også polariteten til peptidet. Aminosyrene er delt inn i grupper etter sidekjedens natur, og kan ha en sidekjede som er upolar og alifatisk, for eksempel leucin, aromatisk (fenylalanin) eller polar og uladet (treonin). Aspartat er eksempel på en aminosyre med negativt ladet sidekjede, mens histidin har en positivt ladet sidekjede. Innenfor hver av disse gruppene er det forskjellige grader av polaritet, størrelse og form. Disse ulike sidekjedene påvirker dermed den totale hydrofobisiteten til et peptid. Dette kan utnyttes i separasjon av ulike peptider, hvor en forskjell mellom to peptider på kun en aminosyre kan ha så stor betydning for polariteten at de kan skilles fra hverandre for eksempel i et kromatografisk system.

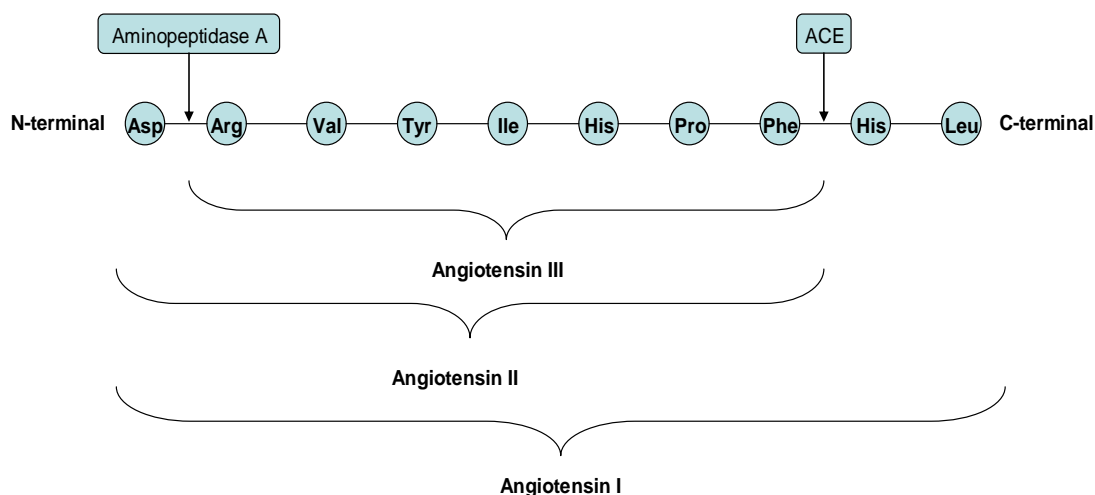
4.2 Angiotensiner

4.2.1 Historie

Det ble tidlig kjent at hypertensjon kunne være forårsaket av virkningen av renin, et proteolytisk enzym som produseres i det juxtaglomerulære apparatet i nyrene. Page og Helmer i USA og Braun-Menendez fra Argentina viste uavhengig av hverandre at renin påvirket en substans i plasma (angiotensinogen) slik at et peptid med vasokonstringerende egenskaper ble dannet. Braun-Menendez kalte peptidet "hypertensin", mens Page betegnet det "angiotonin". I 1958 ble det enighet om at substansen skulle hete "angiotensin". Den første som isolerte rent angiotensin var Leonard T. Skeggs Jr., som inkuberte store mengder renin fra svin med hesteplasma. Aminosyreanalyser viste at angiotensin var et decapeptid. Ved en feiltakelse rensket Skeggs angiotensin med natriumklorid i stedet for destillert vann, og resultatet ble et oktapeptid dannet fra angiotensin som manglet de to siste aminosyrene ved C-terminalen. På denne måten viste Skeggs og hans kollegaer at angiotensin eksisterte i to former [23].

4.2.2 Angiotensinenes fysiologi

Angiotensin I, II og III er alle endogene peptider, og er viktige bestanddeler i renin-angiotensinsystemet. Endogent angiotensin I har en plasmakonsentrasjon på <25 pg/ml, mens angiotensin II sirkulerer i plasma i mengder på mellom 10 og 60 pg/ml [24].



Figur 4-2: Dannelsen av angiotensin II og III fra angiotensin I

Enzymet renin spalter angiotensin I fra angiotensinogen, et plasmaglobulin som dannes i leveren. Angiotensin I har ikke noen biologisk aktivitet i seg selv, men blir spaltet til angiotensin II av angiotensin converting enzyme (ACE) som spalter peptidbindingen mellom Phe⁸ og His⁹ (figur 4-2). ACE er et membranbundet enzym på overflaten av endotelceller som spesielt er lokalisert i lungene, men den vanligste isoformen av ACE finnes også i blant annet hjerte, hjerne, muskler og nyre. Angiotensin II kan derfor dannes lokalt og utøve lokale virkninger uavhengig av sirkulerende angiotensin II i blodbanen. Hovedeffektene av angiotensin II er medierte via en spesifikk membranbundet G-protein-koblet reseptor, angiotensin II subtype 1-reseptor (AT1-reseptor) [23].

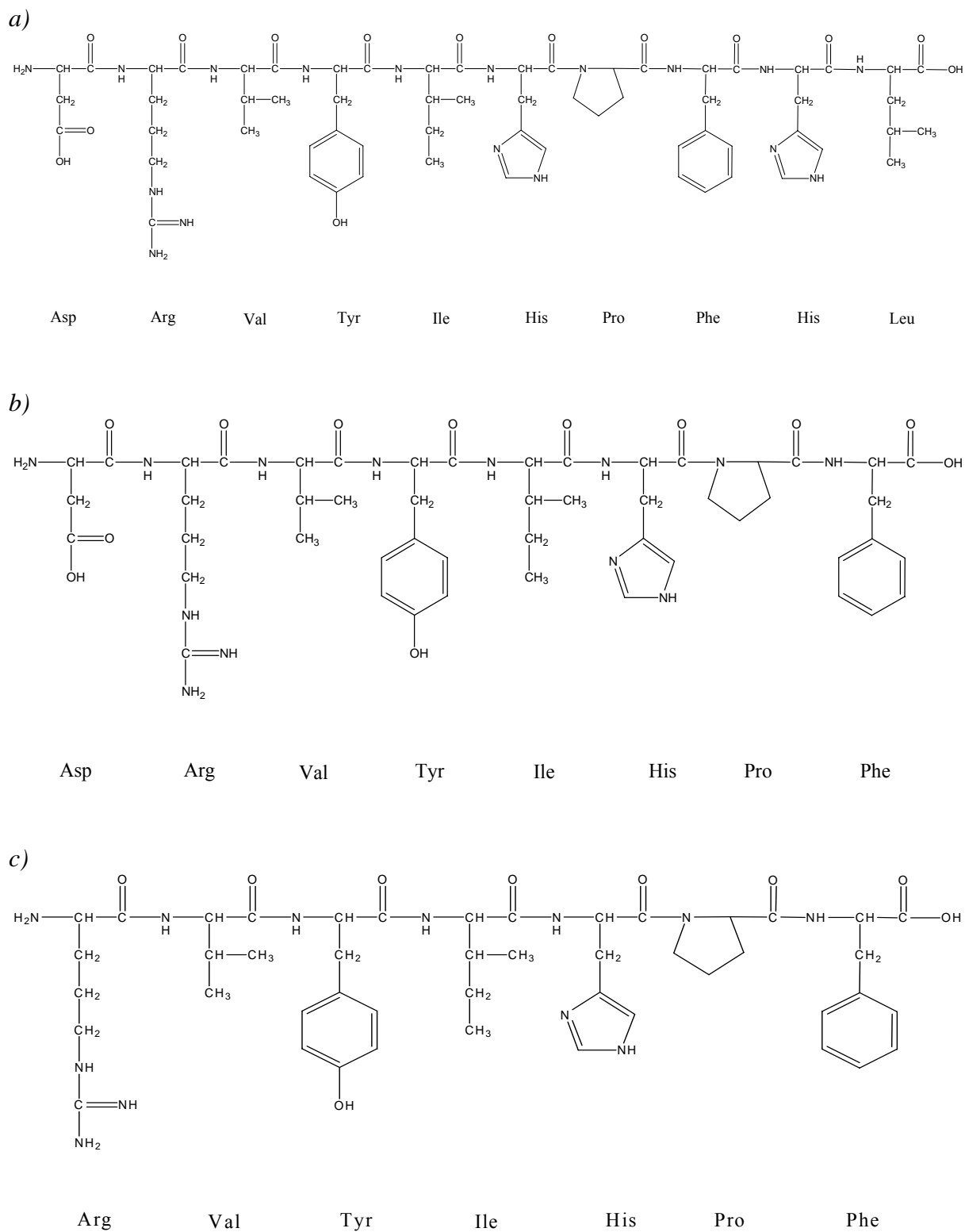
Angiotensin II er involvert i en rekke fysiologiske effekter, blant annet [25]:

- Vasokonstriksjon, spesielt i de efferente arteriolene i nyrene
- Økt frigjøring av noradrenalin fra sympatiske nerveterminaler, på den måten forsterking av vasokonstriksjon og økt hastighet og kraft på hjertekontraksjonen
- Stimulering av proksimal tubulær reabsorpsjon av natriumioner i nyrene
- Utskillelse av aldosteron fra binyrebarken
- Cellevekst i venstre hjerteventrikk og i arterieveggene [26]

Angiotensin II kan videre bli nedbrutt til angiotensin III ved at et enzym, aminopeptidase A, spalter av Asp ved N-terminalen. Det er kjent at angiotensin III blant annet stimulerer aldosteronproduksjonen og er involvert i tørste [25].

4.2.3 Angiotensinenes struktur og kjemi

Angiotensin I, II og III er henholdsvis et decapeptid, oktapeptid og heptapeptid hvis kjemisk struktur er vist i figur 4-3.

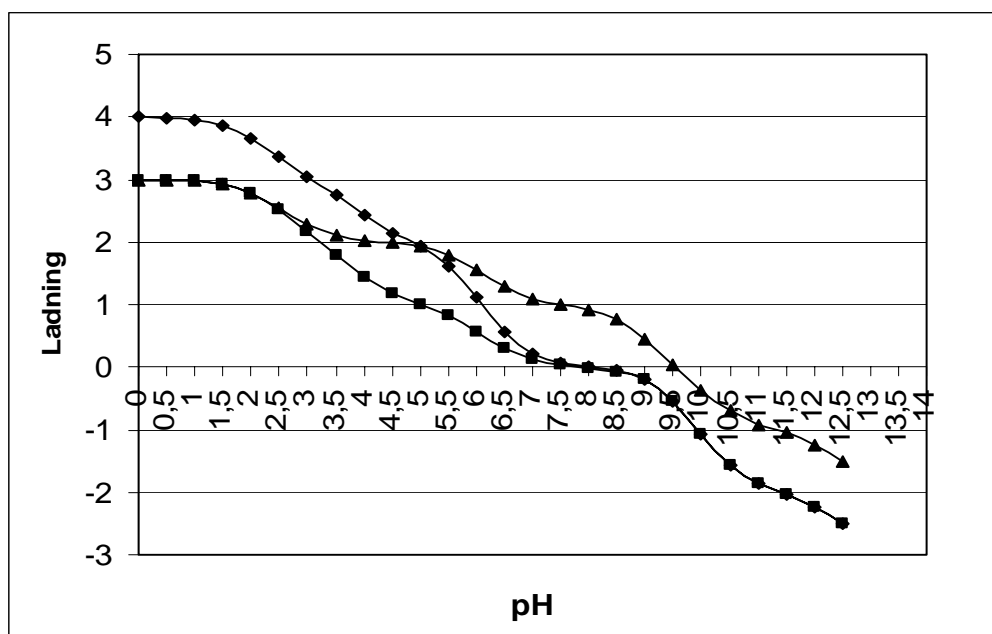


Figur 4-3: Skjematisk struktur av angiotensin I (a), II (b) og III (c)

Tabell 4-1: pK_a-verdier for sidekjeder [22] og log P-verdier for frie aminosyrer ved pH~7 [27]

Aminosyre	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	Leu
log P	-4,25	-4,2	-2,26	-2,26	-1,72	-3,56	-2,54	-1,52	-1,61
pK _a , R-gruppe	3,65	12,48		10,07		6,0			

Tabell 4-1 gir en oversikt over log P-verdier og pK_a-verdier til aminosyrene som inngår i angiotensin I, II og III. Hydrofobisiteten til de forskjellige angiotensinene er ulik og bestemmes blant annet av log P-verdiene til sidekjedene. Angiotensin I er to aminosyrer lenger enn angiotensin II ved C-terminalen (figur 4-3). His og Leu bidrar dermed til at angiotensin I er mer hydrofobt enn angiotensin II. Den eneste forskjellen mellom angiotensin II og III er Asp ved N-terminalen. Denne sidekjeden er imidlertid relativt hydrofil. Ved pH~3,65 vil 50 % av denne aminosyren være negativt ladet, mens ved pH~2,65 vil forholdet mellom uladet og ladet Asp være 90/10. Angiotensin II er derfor mer hydrofilt enn angiotensin III bortsett fra ved lave pH-verdier. Dette er illustrert i figur 4-4, som viser angiotensinenes netto ladning ved ulike pH-verdier. Ved pH<2,5 vil angiotensin II og III ha lik netto ladning fordi Asp er uladet i dette området. Angiotensin I har større netto positiv ladning enn angiotensin II og III ved pH<5 på grunn av His, som er positivt ladet i 90 % av peptidene ved pH~5.

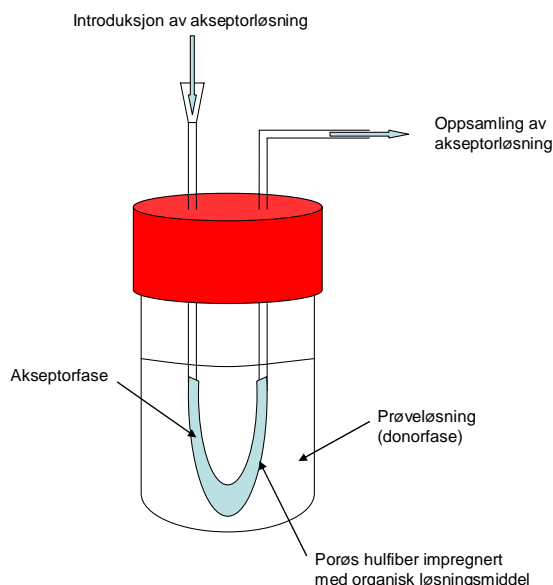


Figur 4-4: Netto ladning av angiotensin I (♦), angiotensin II (■) og angiotensin III (▲) ved ulike pH

Angiotensinene har vært og er gjenstand for stor interesse når det gjelder analyse. Den mest brukte analysemetoden til nå for å detektere peptidene er HPLC-radioimmunoassay (RIA) [24, 28]. Denne teknikken er meget sensitiv og utnytter bindingen mellom peptid og antistoff til analysen. Denne metoden krever bruk av radioaktive stoffer, og er tidkrevende og arbeidsintensiv. Det også er beskrevet andre metoder for prøveoppbehandling og analyse av angiotensiner: Mikrodialyseteknikk kombinert med HPLC-fluorescens deteksjon [29], Cu(II)-kompleksring og kapillærelektroforese (CE) med UV og elektrokjemisk deteksjon [28], fast-fase mikroekstraksjon koblet med LC-MS [30] og fluorimetrisk HPLC med heart-cut kolonnesvitsjingsteknikk [31] er alle brukt til å detektere angiotensin og dens metabolitter.

4.3 Væskefasemikroekstraksjon, LPME

LPME er en relativt ny prøveopparbeidelsesmetode som er utviklet for å kunne isolere og oppkonsentrere legemidler og peptider effektivt fra biologiske væsker i små volum [32, 33].



Figur 4-5: Ekstraksjonsenhet for LPME

Trefase LPME er bygd opp rundt en ekstraksjonsenhet som er illustrert i figur 4-5. Enheten består av fire hoveddeler: Et prøveglass med volum som kan variere mellom 0,1 og 4 ml, samt en skrukork med en silikonseptum, to kanyler og en hulfiber. Kanylene er ført ned i septum, hvorav den ene kanylen er bøyd i 90° vinkel. Spissene på de to kanylene er koblet sammen via den porøse polypropylen hulfiberen som vil danne en loop. Lengden på ekstraksjonsfiberen kan variere mellom 1,5 og 10 cm, avhengig av volum på akseptorfase og donorfase. Indre diameter er $600\ \mu\text{m}$ og porestørrelse $0,2\ \mu\text{m}$. Den rette kanylen benyttes ved introduksjon av akseptorløsning inn i fiberens hulrom, mens kanylen med 90° vinkel anvendes til oppsamling av akseptorløsning etter endt ekstraksjon.

Ved ekstraksjon overføres prøveløsningen (donorfasen) til prøveglasset. Denne løsningen må ha en pH som gjør at substansen som skal ekstraheres er uionisert. Dersom analytten er et ioniserbart molekyl eller et zwitterion, for eksempel et peptid, kan donorfasen inneholde en ionpardanner som danner et kompleks med substansen. Komplekset blir følgelig mer hydrofobt slik at løseligheten i donorfasen reduseres og løseligheten i den organiske fasen favoriseres.

Hulfiberen impregneres med en organisk væske for å skape en organisk fase i porene. Viktige egenskaper til en stabil organisk fase vil være dårlig blandbarhet med vann, relativt lite flyktig, tilstrekkelig selektivitet i ekstraksjonsprosessen og god evne til å fukte fiberen.

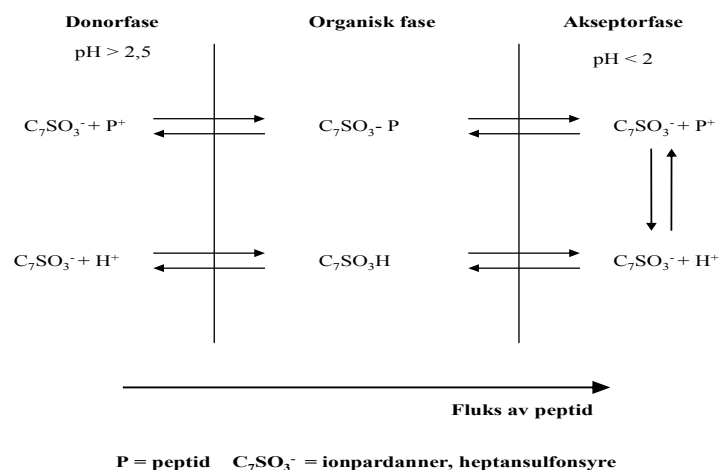
Fiberens indre hulrom fylles med en vandig akseptorfase. pH i denne fasen må være slik at analyttene som befinner seg i den organiske fasen kan ioniseres. Dette vil favorisere analyttenes løselighet i akseptorfase. Skrukorken med kanyler og impregnert hulfiber fylt med akseptorfase monteres på prøveglasset, og hele ekstraksjonsenheten settes på en roterende vibrator mens ekstraksjonen finner sted. Vibratoren sørger for at donor- og akseptorløsningen i nærheten av fiberen hele tiden fornyes slik at ekstraksjonen kan gå hurtigere.

På grunn av den store volumforskjellen mellom donorfase (0,5-4 ml) og akseptorfase (20 µl), vil analytter med høye fordelingskoeffisienter oppkonsentreres i akseptorfase i løpet av ekstraksjonen. I tillegg kan ekstraksjonsprosessen gjøres svært selektiv ved å endre på betingelsene i de forskjellige fasene. LPME fører derfor til høy oppkonsentrering av analyttene og effektiv opprensing av biologiske prøver.

LPME kan også utføres som tofase ekstraksjon [32]. Ved tofase ekstraksjon er akseptorfase et organisk løsningsmiddel, som regel det samme løsningsmidlet som er immobilisert i porene i fiberen. Ekstraksjonsoppsettet er ellers det samme som ved trefase ekstraksjon, og ekstraksjon av både sure, basiske og nøytrale analytter kan utføres. Metoden er imidlertid mest hensiktsmessig til ekstraksjon av analytter som har høyere løselighet i et organisk løsningsmiddel enn i vann. Tofase LPME er godt egnet i kombinasjon med gasskromatografi (GC) da akseptorfase kan injiseres direkte i GC-apparatet. Dersom HPLC eller CE skal benyttes, må løsningsmidlet i akseptorfase dampes av og analytten løses i et vandig medium.

4.3.1 LPME av peptider

Væskefasemikroekstraksjon av peptider er et nytt og interessant felt hvor det er stor usikkerhet rundt ekstraksjonsprinsippene. Denne oppgaven skal generere ny og dypere kunnskap om transport av peptider over den organiske membranen i et LPME-oppsett.



Figur 4-6: Prinsipper for transport av peptider i LPME

Figur 4-6 gir en oversikt over tenkte prinsipper for transport av peptider fra en sur, vandig donorfase, over en organisk membran, og til en sur, vandig akseptorfase. Ved lav pH er peptider som regel positivt ladet og for hydrofile til å kunne diffundere inn i den organiske fasen av seg selv. Ekstraksjon av peptider i trefase LPME i surt miljø forutsetter derfor en negativt ladet ionpardanner som kan danne et kompleks med positivt ladede peptider via ionparbindinger. En sulfonsyre er relativt hydrofob men likevel løselig i vann, og vil derfor egne seg godt som en ionpardanner. Dette komplekset blir tilstrekkelig hydrofob til å vandre inn i porene i den organiske fasen. Ionpardanneren fungerer dermed som et transportmolekyl som kan fremme transport av peptidene. Sulfonsyrekomplekset har større løselighet i organisk fase enn i donorfasen, og likevekten skyves mot organisk fase som vist i figur 4-6. I kontaktområdet mellom organisk fase og akseptorfase vil det skje en ionebytting ved at peptidet løsner fra komplekset og beveger seg over i den sure akseptorfase. H^+ -ioner vil erstatte peptidet i sulfonsyrekomplekset. Resultatet blir en fluks av peptider fra donorfase til akseptorfase. Det vil oppstå en likevekt mellom ionpardanner, peptid og H^+ -ioner i akseptorfase som illustrert i figur 4-6. Lav pH i akseptorfase vil føre til at likevekten i akseptorfase forskyves mot C_7SO_3H . Dette driver igjen ionpardanneren tilbake til den organiske fasen. Hele likevekten over membranen styres derfor trolig av H^+ -konsentrasjonen i akseptorfase.

4.4 Væskekromatografi, HPLC

Et HPLC-apparat består hovedsakelig av 6 enheter: Reservoar for mobilfase, pumpe, injektor, kolonne, detektor og datamaskin. Kolonnen er sete for separasjon av analyttene, og er pakket med små partikler modifisert med en stasjonærfase som gir kolonnen dens hydrofile eller hydrofobe egenskaper. Den vanligste metoden er å binde karbonkjeder i ulike lengder til porøse partikler av silika. Ved normalfasekromatografi har stasjonærfasen hydrofile egenskaper, mens mobilfasen er upolar. I et slikt system vil de mest polare substansene ha størst retensjon.

Den mest anvendte metoden er imidlertid omvendt fase-kromatografi. I dette tilfellet benyttes en ikke-polar stasjonærfase og en polar mobilfase. Modifisert silika med langkjedede alkylgrupper, substituerte alkylgrupper eller andre hydrokarboner utgjør som regel stasjonærfasen i omvendt fase kromatografi. Mobilfasene er blandinger av vann med en organisk komponent som er fullstendig blandbar med vann, ofte metanol eller acetonitril. Dersom det kun benyttes en mobilfase med konstant sammensetning vil en isokratisk eluering finne sted. Man kan imidlertid utføre en gradienteluering, hvor flere mobilfaser med ulik sammensetning benyttes samtidig. Konsentrasjonen av disse mobilfasene vil variere gjennom analysetiden. Fordelen med gradienteluering er at analysetiden blir kortere og retensjonstidene mer stabile.

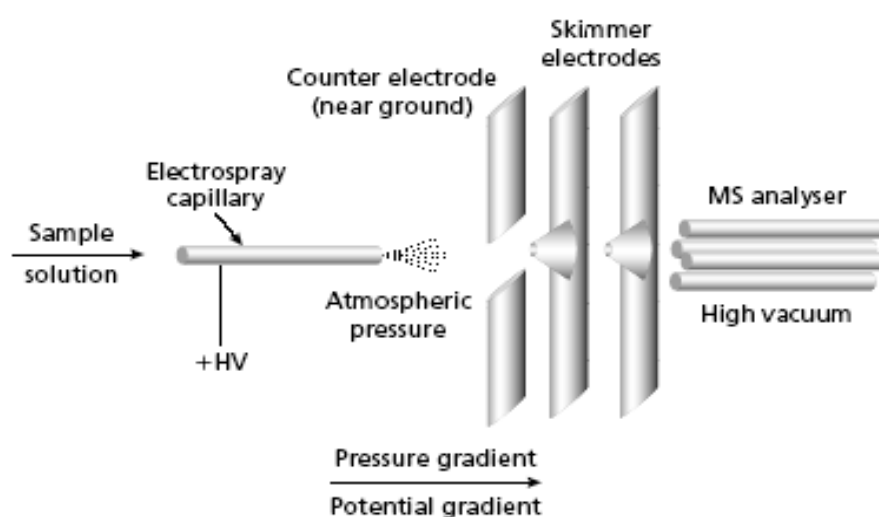
I omvendt fase-kromatografi vil analytter med størst polaritet elueres ut først. Denne retensjonen kan påvirkes av en rekke ulike faktorer:

- Mobilfasens sammensetning. Økende mengde av den minst polare komponenten i mobilfasen reduserer retensjonen
- pH. Syrer får minst retensjon ved høy pH, mens baser får minst retensjon ved lav pH.
- Tilsetningsstoffer. Stoffer som øker prøvens lipofile karakter, for eksempel en ionpardanner, vil gi større retensjon
- Stasjonærfasen. Overflategrupper med lange hydrokarbonkjeder gir større retensjon enn materialer med kortere hydrokarbonkjeder. C18- kolonner er mest brukt i omvendt fase-kromatografi.

Selve analysen foregår ved at en prøve injiseres inn i HPLC-apparatet, enten manuelt eller ved hjelp av en autoinjektor. En jevn strøm av mobilfase fører med seg analyttene frem til kolonnen, hvor de retarderes av stasjonærfasen. I en gradient vil stoffene komme fra kolonnen når innholdet av den organiske komponenten i blandingen av mobilfaser er høy nok til å bryte bindingene mellom analytten og den stasjonære fasen. Analytten detekteres deretter i en detektor, og man kan velge om en kun vil ha en identifisering av stoffet eller om det er ønskelig å måle kvantitet ved å benytte areal eller topphøyde. Vanlige deteksjonsprinsipper i HPLC er UV, brytningsindeks, fluorescens og elektrokjemisk deteksjon, hvor deteksjon basert på absorbans av ultrafiolett lys er den mest anvendte metoden.

4.5 LC-MS

Bruk av massespektroskopi (MS) som deteksjonsprinsipp i væskerkromatografi (LC) gir en svært følsom analysemetode. LC-MS består vanligvis av et kromatografisk system, en ionekilde, et kapillær og et sett samlere og linser, en masseanalysator og en ioneanalysator. Analyttene som er separert i det kromatografiske systemet ioniseres i ionekilden, enten ved hjelp av elektropray (ESI) eller kjemisk ionisering (CI). I begge tilfeller er det svært viktig å benytte en flyktig mobilfase. Ikke-flyktige mobilfaser kan føre til saltdannelse i ionekilden og tilstopping av kapillæret. Mobilfaser som ofte benyttes i LC-MS er for eksempel acetonitril, metanol, maursyre, eddiksyre eller kombinasjoner av disse.

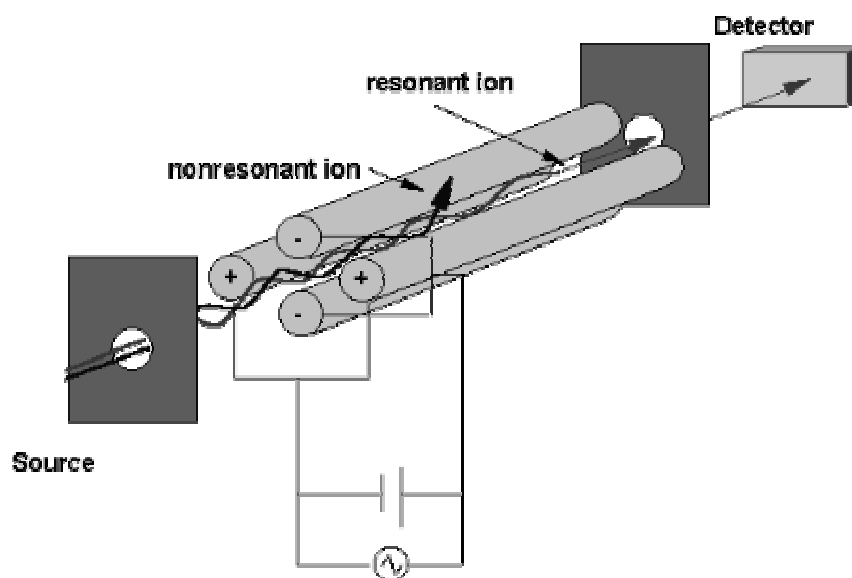


Figur 4-7: Skisse av et massespektrometer med elektropray

I denne oppgaven ble ESI benyttet som ioniseringsteknikk. Figur 4-7 viser en skjematisk oversikt over prinsippet for elektropray. Mobilfasen med analytter fra LC føres inn i en liten nål. En forstøvergass og et elektrisk spenningsfelt mellom kapillæret og en elektrode fører til at væsken fordampes i store ladede dråper. Avhengig av spenningen er disse dråpene enten positivt eller negativt ladet. En tørkegass som strømmer i motsatt retning av elektropraysen sørger for å fjerne mobilfasen og å redusere dråpestørrelsen. Etter hvert som dråpestørrelsen blir mindre, vil den indre spenningen mellom ionene i dråpene bli større enn overflate-spenningen. Dette fører til at de eksploderer slik at størrelsen blir ytterligere redusert. Denne prosessen repeteres inntil alle ionene i prøven er løsrevet fra dråpen og fordampet. På vei inn i masseanalysatoren passerer ionene et kapillær, noen samlere og linser. Fra inngangen av kapillæret til utgangen av samlerne er trykket redusert fra atmosfærisk trykk til 10^{-6} – 10^{-8} Torr.

Spenningen ved inngangen av kapillæret er alltid motsatt av ionenes ladning, og fører til akselerering av ionene. Linsene fokuserer ionestrømmen frem mot masseanalysatoren.

I LC-MS er kvadrupol og ionetrapp de mest brukte masseanalytorene. En kvadrupol består av fire parallelle staver som pålegges en fast likespenning og en vekselspanning (figur 4-8). Ioner som strømmer inn i kvadrupolfeltet blir påvirket av denne spenningen. Avhengig av masse/ladningsforholdet vil ionene som oppnår stabile svingninger i dette feltet slippes gjennom en etter en til detektoren. Denne detektoren gjør mengden av ioner om til elektrisk strøm, som blir målt og presentert som et kromatogram ved hjelp av en datamaskin [34]. Ustabile ioner vil kollidere med en av sylindrene i kvadrupolen og kan derfor aldri nå detektoren.



Figur 4-8: Skjematisk oversikt over en enkel kvadrupol

Sammenlignet med tradisjonelle analysemetoder har LC-MS mange fordeler dersom systemet skal benyttes i bioanalyse: lav deteksjonsgrense (ned til pg-nivå), kort analysetid, høy spesifisitet, anvendelig til de fleste analytter og god presisjon og nøyaktighet. Men på grunn av den høye følsomheten kan selv ubetydelige forurensninger påvirke kvantifiseringen.

Dersom bioanalyse skal utføres på LC-MS er det avgjørende med en god prøveopparbeidelse for å fjerne interfererende substanser og konsentrere analytten. Slike interfererende komponenter kan forårsake ionesuppressjon, noe som vil påvirke den kvantitative analysen.

4.6 Plasma og proteinfelling

Plasma er den vanligste biologiske matriksen i analytisk sammenheng. Plasma utgjør ca 55 % av blodvolumet, og kan isoleres etter sentrifugering av blod tilsatt et middel som forhindrer koagulasjon. Plasma og annet biologisk materiale er ikke kjemisk og bakteriologisk stabilt, og fryses derfor vanligvis ned umiddelbart etter prøvetaking for å forhindre nedbrytning.

Plasma er en svak gulfarget, litt klebrig og svakt alkalisk væske (pH~7,4). I tillegg til vann består plasma av 7-8 % proteiner, ca 0,9 % salter, ca 0,1 % sukker og mindre mengder fett, aminosyrer, urinstoff, gallefargestoffer med mer [35].

Plasmaproteiner vil ofte skape problemer i analysesammenheng. Proteinene vil tette kolonnen og ødelegge separasjonssystemet dersom plasma injiseres direkte inn i et HPLC-system. Det vil derfor være viktig å opparbeide prøven slik at proteinene fjernes før prøven analyseres. Dersom LPME benyttes som prøveoppbeidelsesteknikk, isoleres analyttene fra plasma idet de ekstraheres over i akseptorfasen. Det vil derfor ikke være proteiner tilstede i prøven som skal analyseres. Men i LPME av peptider må det tilsettes syre og ionpardanner til plasma for å fremme transporten over membranen. Proteinene i plasma blir netto positivt ladet når matriksen surgjøres. Tilsetning av en negativt ladet ionpardanner kan derfor føre til dannelse av uløselige komplekser av proteiner og ionpardanner. Slik fører plasmaproteinene til at det ikke er mulig å etablere en donorfase med ionpardanner i surgjort plasma. Dette problemet kan løses ved å fjerne proteinene før justering av pH og tilsetning av ionpardanner. Proteinfelling vil gi en klar supernatant som kan opparbeides videre med LPME.

Reagenser som kan tilsettes plasma for å felle proteinene kan deles inn i fire hovedgrupper:

- Syrer, for eksempel trikloreddiksyre og perklorsyre
- Organiske løsningsmidler som er blandbare med vann slik som metanol og acetonitril
- Basiske løsninger kombinert med metallsalter slik som natriumhydroksid tilsatt sinksulfat
- Mettede saltløsninger, for eksempel ammoniumsulfat

Av gruppene med fellingsreagenser nevnt ovenfor er syrer og organiske løsningsmidler mest vanlig å bruke i proteinfelling [35]. Dersom et organisk løsningsmiddel skulle benyttes som fellingsreagens før prøveopparbeidelse med LPME, ville hele ekstraksjonen bli forstyrret. Overskudd av organisk løsningsmiddel i den vandige donorfasen ville diffundert inn i den organiske fasen i LPME-oppsettet og forstyrret likevektene. Dessuten ville små mengder av organisk løsningsmiddel i akseptorfasen skapt problemer med retensjonstidene på en HPLC-kolonne. I denne oppgaven ble derfor to ulike syrer valgt som proteinfellingsreagens. Syrene danner uløselige salter med de positivt ladede aminogruppene i proteinene ved pH under det isoelektriske punktet (pI). Ved dette punktet har proteinene ingen netto ladning, og løseligheten til proteinene er lavest ved denne pH-verdien. Over pI er netto ladning negativ, mens proteinene er netto positivt ladet ved pH under pI . Syrer som proteinfellingsreagens fører dessuten til at pH i donorfasen automatisk blir lav, og må i enkelte tilfeller justeres opp til ønsket nivå (2,5-3,5) med en base.

Sinksulfat i basisk løsning ble også forsøkt som fellingsreagens. De positivt ladede metallionene reduserer løseligheten til plasmaproteinene ved å forandre deres isoelektriske punkt [36]. Dessuten vil metallionene konkurrere med protonene i løsningen om setene på aminosyrene, og pH i løsningen blir følgelig lavere. Endring av pI kombinert med lavere pH fremmer proteinfellingen. Natriumhydroksid vil slokke de positive ladningene på proteinet og gjøre det ytterligere hydrofobt.

Det er viktig at analytten som skal bestemmes har god løselighet i proteinfellingsreagenset. Dersom dette ikke er tilfelle, vil analyttene kunne felle ut sammen med proteinene, og utbyttet blir lavt og variabelt. Innkapsling av analyttene under fellingsprosessen kan også skape et problem. På denne måten kan analyttene felles ut selv om de i utgangspunktet er løselige i fellingsreagenset.

5 MATERIALER OG METODER

5.1 Kjemikalier og utstyr

Tabell 5-1, 5-2 og 5-3 viser peptider, kjemikalier og utstyr som er benyttet under prosjektet.

Tabell 5-1: Angiotensiner

<i>Peptider</i>	<i>Leverandør</i>
Angiotensin I, acetatsalt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Angiotensin II, acetatsalt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Angiotensin III, acetatsalt	Fluka, Buchs, Sveits

Tabell 5-2: Kjemikalier (fortsettelse neste side)

<i>Kjemikalier</i>	<i>Kvalitet</i>	<i>Leverandør</i>
Acetonitril	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammoniakk-løsning, 25 %	p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
n-decylalkohol		Sigma, St.Louis, MO, USA
Captopril		Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Dihexyleter	≥97%	Fluka, Buchs, Sveits
Dibutylfosfat	≥97%	Fluka, Buchs, Sveits
Dinatriumhydrogenfosfat	p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dodecylacetat	97%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Eddiksyre	p.a.	Prolabo, Manchester, England
Heksanol		Fluka, Buchs, Sveits
1-heptanol		Sigma, St.Louis, MO, USA
1-heptansulfonsyre, natriumsalt		Sigma, St.Louis, MO, USA
1-heptansulfonsyre, natriumsalt, monohydrat	~98%	Fluka, Buchs, Sveits
1-oktanol	99%	Aldrich, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Maursyre	>98%	Riedel de Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Tyskland
Metanol	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland

<i>m</i> -fosforsyre	p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumacetat, vannfri	p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat	p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid pellets	p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
1-nonanol	~98%	Sigma, St. Louis, MO, USA
Saltsyre, HCl	p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Sinksulfat heptahydrat	>99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Triklorediksyre		Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Trinatriumcitrat-2-hydrat	p.a.	Merck, Darmstadt, Tyskland
Humant plasma		Ullevål universitetssykehus, Oslo, Norge
Vann		Renset med EASYPure UV

Tabell 5-3: Utstyr (fortsettelse neste side)

<i>Utstyr</i>	<i>Modell</i>	<i>Leverandør</i>
HPLC-apparatur		
Forkolonne	Javelin guard BDS-C8, 10x2MM	Thermo
Kolonne	ChromSep HPLC 50x2,0mm Inertsil [®] ODS-3	Varian, Middelburg, Nederland
Pumpe	LC-9A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Blandekammer	FCV-10AL <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan
Autoinjektor	231-401	Gilson, Middletown, WI, USA
Detektor	SPD-6AV	Shimadzu, Kyoto, Japan
Programvare	Class VP v.4.3	Shimadzu, Kyoto, Japan
MS-apparatur		
Kolonne	ChromSep HPLC 50x2,0mm Inertsil [®] ODS-3	Varian, Middelburg, Nederland
Pumpe	LC-10AD <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan
Autoinjektor	SIL-10AD <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan
Systemkontroller	SCL-10AD <i>vp</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan
Detektor	LCMS-2010	Shimadzu, Kyoto, Japan

Programvare	LCMSsolution	Shimadzu, Kyoto, Japan
Annet		
Kanyle	0,8x40mm	Terumo, Tokyo, Japan
	0,8x50mm	Terumo, Tokyo, Japan
Prøveglass	500x2-DV	Chromacol, Trumbull, CT,USA
Mikroinserts	0,2 ml	VWR International, Leuven, Belgia
Kork m/septum	500x11-DSC(R)-ST14x 147/205	Chromacol, Trumbull, CT,USA
Eppendorfrør	1,5ml	Brand
Sprøyte	2ml	Terumo, Tokyo, Japan
Ekstraksjonsfiber	Accurel [®] PP Q3/2 Polypropylen hulfiber (i.d.600 µm, veggykkelse 200 µm, porestørrelse 0,2 µm)	Membrana, Wuppertal, Tyskland
pH-meter	E 632 Digitalt pH-meter	Metrohm, Herisau, Sveits
pH-papir	Acilit [®] pH 0-6	Merck, Darmstadt, Tyskland
Vibrator	Vibramax 100	Heidolph, Kelheim, Tyskland
Vortex-mikser	Vibrofix VF1	Janke&Kunkel, Staufen, Tyskland
Ultralydbad	Branson 2200	Branson, Connecticut, USA
Vekt	AE 200	Metler, Sveits
Sentrifuge	Hettich Universal	Hettich, Tyskland
Sentrifugerør	15ml	Kendall
Automatpipette	Finnpipette [®]	Labsystems, Helsingfors, Finland
Pipettespiss	Finntip [®]	Labsystems, Helsingfors, Finland
Injeksjonssprøyte	Microliter #805	Hamilton, Bonaduz Sveits
Vannrenseanlegg	EASYpure [™] UV D7402	Barnstead, Dubuque, IA, USA

5.2 *Prøveopparbeidelse*

Alle prøvene ble opparbeidet med trefase væskefasemikroekstraksjon. Prøveløsningen, eller donorfasen, bestod i all hovedsak av vann eller humant plasma, peptider, ionpardanner og syre. Denne løsningen ble overført til prøveglasset etter tilberedning ved hjelp av en automatpipette. To kanyler med ytre diameter 0,8 mm og lengde på hhv 40 og 50 mm ble stukket gjennom et silikonseptum i ekstraksjonsenhetens skrukork som vist i figur 4-5 (s.16). Plastflensen på den lengste kanylen ble fjernet før toppen av kanylen ble bøyd i 90° vinkel. Kanylespissene ble koblet sammen via en porøst hulfiber av polypropylen med følgende dimensjoner: Lengde 6 cm, indre diameter 600 µm og porestørrelse på 0,2 µm.

Hulfiberen ble dyppet i *n*-oktanol i 5 sekunder slik at porene i fiberen ble mettet med organisk løsningsmiddel. *n*-oktanol har vist gode resultater i tidligere studier [21, 37], og ble stort sett benyttet som organisk fase.

Den impregnerte fiberen ble behandlet på ultralydbad i 20 sekunder for å fjerne eventuelt overskudd av organisk løsningsmiddel. Vannet fra ultralydbadet som ble liggende utenpå fiberen ble forsiktig fjernet med et papirtørkle. Deretter ble 20 µl akseptorfase ved hjelp av en mikrolitersprøyte injisert inn i fiberens hulrom via den ene kanylen som fremdeles hadde plastflens. Skrukorken med kanyler og fiber ble så montert på prøveglasset med donorfase. Hele ekstraksjonsenheten ble plassert på en roterende vibrator i 45 min med en hastighet på 1000 rpm.

Etter endt ekstraksjon ble akseptorfase overført til en 200 µl prøvebeholder. Det ble injisert 50 µl av en løsning med 10mM maursyre og 5mM heptansulfonsyre inn i kanylen som ble brukt ved introduksjon av akseptorfase. Den andre kanylen ble brukt som utførselsgang. Løsningen ble skylt gjennom fiberen for å unngå at peptider som hadde blitt ekstrahert over i akseptorfase ble hengende igjen på fiberveggen. Disse ble vasket ut sammen med fortynningsvæsken og over i prøvebeholderen. Siste rester av væske inne i fiberens hulrom ble fjernet ved å legge lufttrykk på kanylen med plastflens ved hjelp av en sprøyte. Det ble tilsatt 20 µl 0,1M NaOH til prøvebeholderen for å heve pH i akseptorfase til ca 3 slik at den ble kompatibel med HPLC. Den totale væskemengden i prøvebeholderen var 90 µl. Hver ekstraksjonsenhet var beregnet for en gangs bruk. Dette er en stor fordel da faren for carry-over-effekt elimineres fullstendig. Kanylene ble vasket og tørket for gjenbruk.

5.3 HPLC

Den vandige komponenten i mobilfasene bestod av 10mM maursyre (CHOOH) og 5mM 1-heptansulfonsyre ($C_7SO_3^-$). Denne ble laget ved at 1,011 g 1-heptansulfonsyre ble løst i ca 800 ml destillert vann og tilsatt 377 μ l maursyre. Destillert vann ble etterfylt til 1,0 L.

Løsningen ble blandet med acetonitril (ACN) i følgende forhold:

Mobilfase A: 5 % ACN i 10mM CHOOH og 5mM $C_7SO_3^-$

Mobilfase B: 95 % ACN i 10mM CHOOH og 5mM $C_7SO_3^-$

For å optimalisere gradienten ble det utført en rekke analyser hvor forholdet mellom mobilfase A og B, samt varighet på gradienten ble endret. Gradienten var optimal når angiotensin I, II og III var grunnlinjeseparert. I tillegg skulle alle de tre peptidene komme fra kolonnen innenfor den perioden hvor det går en gradient på kolonnen. Dette vises på kromatogrammet som en nedadgående grunnlinje. Den endelige gradienten er vist i tabell 5-4.

Kolonnen som ble benyttet var en ChromSep HPLC 50X2 mm Inertsil[®] ODS kolonne. En stasjonærfase som består av C18-alkylkjeder har stor lineær kapasitet [38]. En Inertsil[®]-kolonne ble valgt fordi det var ønskelig med maskerte restsilanolgrupper i pakkematerialet. Dette vil gi mindre haledannelse av basiske stoffer ved analyse.

Peptidene ble detektert med UV-lys med en bølgelengde på 214 nm.

Tabell 5-4: HPLC-gradient

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Flow (ml/min)
0	91,5	8,5	0,5
20,75	66,6	33,4	0,5
22,75	66,6	33,4	0,5
23,75	91,5	8,5	0,5
51	91,5	8,5	0,0

Pumpene og slangene i HPLC-systemet ble vasket i 5 min med 10 % metanol i vann før hver analyserekke. Kolonnen ble før og etter hver analyserekke vasket med 100 % mobilfase A i 5 min for å fjerne salter og 100 % mobilfase B i 5 minutter for å fjerne eventuelle

forurensninger som satt på kolonnen. Deretter ble startinnstillingene for gradienten (91,5 % A, 8,5 % B) kjørt gjennom kolonnen i 10 min for å sette den i likevekt før analysene startet. Første prøve i hver rekke, samt hver 10. prøve var en blank prøve som bestod av destillert vann. Dette ble gjort for å kontrollere at gradienten fungerte korrekt og at det ikke var noen carry-over-effekt tilstede i systemet. En blank prøve kunne dessuten avsløre om det var nedbrytningsprodukter eller forurensninger i de andre prøvene. Det ble også analysert 3 paralleller av referanseløsninger med angiotensin I, II og III i vann i begynnelsen av hver analyserekke. Analysetid for hver prøve var 45 min, inkludert likevektsinnstilling av kolonnen (5 kolonnevolum). Volumet på loopen som ble benyttet var 50 µl, og 50 µl prøve ble injisert i HPLC.

5.4 LC-MS

Det ble utviklet en analysemetode for analyse av angiotensin I, II og III på LC-MS på grunnlag av tidligere studier [39]. Mobilfase A bestod av 200 µl HCOOH i 200 ml ionebyttet vann (0,1 % v/v), mens ren acetonitril utgjorde mobilfase B. Kolonnen som ble benyttet var identisk med kolonnen som ble brukt i HPLC, en ChromSep HPLC 50X2 mm Inertsil® ODS kolonne. Det ble utviklet en gradient som er vist i tabell 5-5.

Det ble benyttet en 50 µl loop under analysene, og injeksjonsmengde var 50 µl. Elektrospray (ESI) i positiv mode ble brukt som ionekilde. Her ble nitrogen (N₂) benyttet som forstøvergass med en hastighet på 1,5 l/min. N₂ ble også brukt som tørkegass, med en hastighet på 20 l/min. Av øvrige betingelser kan det nevnes at spenningen over proben i ionekilden var 4,5 kV og kapillærtemperatur 200 °C. Som masseanalysator ble det benyttet en enkel kvadrupol.

Tabell 5-5: LC-MS-gradient, flow 0,2 ml/min

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0	90	10
9,6	50	50
10,6	50	50
11,5	90	10
16	90	10

5.5 LPME i vann

5.5.1 Tillaging av peptidløsninger

Stamløsninger av peptider ble laget ved at 1000 µg av hvert av angiotensin I, II og III ble veid inn på analysevekt og løst i 10 ml destillert vann i dramsglass. Disse stamløsningene hadde en konsentrasjon på 100 µg/ml. Deretter ble 100 µl av disse løsningene fortynnet i 900 µl destillert vann. Disse løsningene på 10 µg/ml ble så pipettert over i små prøveglass og frosset ned til -32°C. Stamløsningene ble også frosset ned. En blanding av de tre peptidene ble laget ved at 0,5 ml stamløsning (100 µg/ml) av hvert angiotensin ble blandet sammen med 0,5 ml destillert vann. Konsentrasjonen på peptidene i denne blandingen var 20 µg/ml.

5.5.2 Donorvolum

Det er ofte lite prøvemateriale tilgjengelig dersom man skal analysere biologiske prøver. Derfor vil det også være fordelaktig med så små donorvolum som mulig i LPME-forsøkene. Et donorvolum på 200 µl i mikroinserts viste seg å være vanskelig å gjennomføre i praksis. På grunn av prøvebeholderens størrelse og slanke form måtte fiberen bøyes og brettes før den kunne føres ned i donorfasen. Dette medførte en brekk på fiberen i ekstraksjonsenheten. Det skulle derfor undersøkes hvordan større volum på donorfasen ville ha innvirkning på utbytte. En rekke med ulike volum på donorfasen i forskjellige prøvebeholdere ble laget som vist i tabell 5-6. Som donorfase ble det valgt saltsyre i en konsentrasjon på 0,3mM, pH~3,7, og en ionpardannerkonsentrasjon (heptansulfonsyre) på 50mM. Denne løsningen ble tilsatt en blanding av 20 µg/ml angiotensin I, II og III slik at sluttkonsentrasjon av peptid i donorfasen ble 5 µg/ml.

Som akseptorfase ble det valgt 0,01M HCl, pH~2. *n*-oktanol ble benyttet som organisk fase.

Tabell 5-6: Tillaging av forskjellige donorvolum

Donorvolum	Volum 0,3mM HCl, 50mM C ₇ SO ₃ ⁻	Volum peptidblanding (20 µg/ml)	Prøvebeholder
0,2 ml	150 µl	50 µl	Mikroinserts, glass
0,6 ml	450 µl	150 µl	Eppendorfrør, plast
1,0 ml	750 µl	250 µl	Prøveglass
1,5 ml	1125 µl	375 µl	Prøveglass

5.5.3 pH i donor

pH i donorfasen er en viktig faktor i LPME-prosessen for å få optimal ladning av peptidene. Når pH i donorfasen er tilstrekkelig lav, vil karboksylsyregruppene på peptidene være uladet. Samtidig er aminogruppene positivt ladet, og komplekset som dannes med heptansulfonsyren blir derfor hydrofobt nok til å diffundere inn i organisk fase. Dersom pH i donorfasen blir for lav vil sulfonsyren ha større affinitet til H^+ -ionene enn peptidene, og graden av kompleksdannelse blir mindre. Kompleksene som diffunderer inn i organisk fase vil løses like lett i donorfase som i akseptorfase. På denne måten kan peptidtransporten bli mindre effektiv ved for liten forskjell i pH mellom donorfase og akseptorfase. Målet var dermed å bestemme en pH-verdi som gav høyest mulig utbytte ved konstante forhold i organisk- og akseptorfase, samt konstant konsentrasjon av ionpardanner.

Donorfasene i forsøket bestod av 375 μ l 20 μ g/ml peptidblanding til en sluttkonsentrasjon av peptid på 5 μ g/ml, og 1125 μ l (x mM HCl, 50mM C_7SO_3Na) som ble laget i henhold til tabell 5-7. Akseptorfase, 0,01M HCl, og organisk fase, *n*-oktanol, ble holdt konstant i alle forsøk.

Tabell 5-7: HCl-løsninger med forskjellige pH-verdier

pH	Ulik konsentrasjon HCl, 50 mM heptansulfonsyre	Prosedyre for tillaging av HCl og 50mM heptansulfonsyre
1,17	0,1M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	2,5ml 0,2M HCl ble fortynnet med 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
1,54	0,03M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	0,75ml 0,2M HCl ble fortynnet med 1,75ml destillert vann og 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
2,00	0,01M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	830 μ l konsentrert saltsyre ble fortynnet med 999,17ml destillert vann, og 0,0101g $C_7SO_3^-$ ble løst i 10ml 0,01M HCl
2,55	0,003M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	1,5ml 0,01M HCl ble fortynnet med 1,0ml destillert vann og 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
3,01	0,001M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	0,5ml 0,01M HCl ble fortynnet med 2,0ml destillert vann og 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
3,66	0,3mM HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	300 μ l 0,1M HCl ble fortynnet med 4,70ml destillert vann til 0,6mM. 2,5ml 0,6mM HCl ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
4,27	0,1mM HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	100 μ l 0,1M HCl ble fortynnet med 4,90ml destillert vann til 0,2mM. 2,5ml 0,2mM HCl ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
4,91	0,03mM HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	30 μ l 0,1M HCl ble fortynnet med 4,97ml destillert vann til 0,06mM. 2,5ml 0,06mM HCl ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
5,33	0,01mM HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	10 μ l 0,1M HCl ble fortynnet med 4,99ml destillert vann til 0,02mM. 2,5ml 0,02mM HCl ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$

Det viste seg å være vanskelig å ha god kontroll på pH med HCl. Derfor ble forskjellige buffere undersøkt i de pH-områdene ($>3,7$) som lave konsentrasjoner av HCl ikke kunne kontrollere pH ($<0,3\text{mM}$). Acetat-, fosfat- og citratbuffer ble testet ut i forskjellige pH-områder, og løsningene ble laget som vist i tabell 5-8, 5-9 og 5-10. Donorfasene i bufferforsøkene bestod av $750\text{ }\mu\text{l}$ (buffer, $50\text{mM C}_7\text{SO}_3^-$) og $250\text{ }\mu\text{l}$ $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ peptid-blanding til en sluttkonsentrasjon på $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ peptid. LPME ble utført med konstant pH (~ 2) i akseptorfase og *n*-oktanol som organisk fase i alle forsøkene.

Tabell 5-8: 25mM acetatbuffer med forskjellige pH-verdier

pH	Prosedyre for tillaging av 25mM acetatbuffer, 50mM heptansulfonsyre
3,95	En 25mM løsning av CH_3COOH ($71,5\mu\text{l}$ i 50ml vann) ble titrert med en 25mM løsning av CH_3COONa ($0,1025\text{g}$ løst i 50 ml vann) til $\text{pH}\sim 4,02$. 2,5ml buffer ble tilsatt $2,5\text{ml } 100\text{mM C}_7\text{SO}_3^-$
4,89	En 25mM løsning av CH_3COOH ($71,5\mu\text{l}$ i 50ml vann) ble titrert med en 25mM løsning av CH_3COONa ($0,1025\text{g}$ løst i 50 ml vann) til $\text{pH}\sim 5,01$. 2,5ml buffer ble tilsatt $2,5\text{ml } 100\text{mM C}_7\text{SO}_3^-$

Tabell 5-9: 25mM fosfatbuffer med forskjellige pH-verdier

pH	Prosedyre for tillaging av 25mM fosfatbuffer, 50mM heptansulfonsyre
5,78	En 25mM løsning av NaH_2PO_4 ($0,1725\text{g}$ løst i 50ml vann) ble titrert med en 25mM løsning av Na_2HPO_4 ($0,2225\text{g}$ løst i 50ml vann) til $\text{pH}\sim 6,01$. 2,5ml buffer ble tilsatt $2,5\text{ml } 100\text{mM C}_7\text{SO}_3^-$
6,81	En 25mM løsning av NaH_2PO_4 ($0,1725\text{g}$ løst i 50ml vann) ble titrert med en 25mM løsning av Na_2HPO_4 ($0,2225\text{g}$ løst i 50ml vann) til $\text{pH}\sim 7,01$. 2,5ml buffer ble tilsatt $2,5\text{ml } 100\text{mM C}_7\text{SO}_3^-$
7,77	En 25mM løsning av NaH_2PO_4 ($0,1725\text{g}$ løst i 50ml vann) ble titrert med en 25mM løsning av Na_2HPO_4 ($0,2225\text{g}$ løst i 50ml vann) til $\text{pH}\sim 8,01$. 2,5ml buffer ble tilsatt $2,5\text{ml } 100\text{mM C}_7\text{SO}_3^-$

Tabell 5-10: 12,5mM citratbuffer med forskjellige pH-verdier

pH	Prosedyre for tillaging av 12,5mM citratbuffer, 50mM heptansulfonsyre
2,76	0,3676g trinnatriumcitrat dihydrat ble veid inn og løst i ca 80ml vann. Denne løsningen ble titrert med 0,2M HCl til pH~2,48 før den ble tilsatt vann til 100ml. 2,5ml buffer ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
3,23	0,3676g trinnatriumcitrat dihydrat ble veid inn og løst i ca 80ml vann. Denne løsningen ble titrert med 0,2M HCl til pH~2,98 før den ble tilsatt vann til 100ml. 2,5ml buffer ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
3,84	0,3676g trinnatriumcitrat dihydrat ble veid inn og løst i ca 80ml vann. Denne løsningen ble titrert med 0,2M HCl til pH~3,51 før den ble tilsatt vann til 100ml. 2,5ml buffer ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
4,07	0,3676g trinnatriumcitrat dihydrat ble veid inn og løst i ca 80ml vann. Denne løsningen ble titrert med 0,2M HCl til pH~4,00 før den ble tilsatt vann til 100ml. 2,5ml buffer ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
4,55	0,3676g trinnatriumcitrat dihydrat ble veid inn og løst i ca 80ml vann. Denne løsningen ble titrert med 0,2M HCl til pH~4,50 før den ble tilsatt vann til 100ml. 2,5ml buffer ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$
5,04	0,3676g trinnatriumcitrat dihydrat ble veid inn og løst i ca 80ml vann. Denne løsningen ble titrert med 0,2M HCl til pH~5,00 før den ble tilsatt vann til 100ml. 2,5ml buffer ble tilsatt 2,5ml 100mM $C_7SO_3^-$

5.5.4 Konsentrasjon av heptansulfonsyre i donorfase

Det var uklart om transporten av angiotensinene over membranen virkelig var avhengig av en ionpardanner, og eventuelt hvor høy konsentrasjon av denne ionpardanneren som var tilstrekkelig til at en transport kunne finne sted. Ekstraksjoner med ulike konsentrasjoner av heptansulfonsyre ble derfor utført. Det ble laget 5 ml av hver løsning som vist i tabell 5-11. Forsøkene ble utført ved konstant pH i donorfase. pH~3,66 (0,3mM HCl) ble valgt da dette nivået gav høyest utbytte i tidligere forsøk.

Tabell 5-11: Forskjellig konsentrasjon heptansulfonsyre i donor, konstant pH

Konsentrasjon $C_7SO_3^-$	Volum (600mM $C_7SO_3^-$, 0,3mM HCl)	Volum 0,3mM HCl	Volum, ferdig løsning xmM $C_7SO_3^-$, 0,3mM HCl	pH
0mM	0 ml	5, 0ml	5,0 ml	3,69
75mM	0,625 ml	4,375 ml	5,0 ml	3,69
150mM	1,25 ml	3,75 ml	5,0 ml	3,78
300mM	2,5 ml	2,5 ml	5,0 ml	3,90

Donorfasene ble laget ved at 1125 µl av hver av de ferdige løsningene i tabell 5-11 ble blandet med 375 µl peptidblanding (20 µg/ml) slik at sluttkonsentrasjon av peptider i donorfase ble 5 µg/ml. Ekstraksjonene ble utført med konstante forhold i organisk fase (*n*-oktanol) og akseptorfase (0,01M HCl, pH~2).

5.5.5 Dibutylfosfat som ionpardanner

Dibutylfosfat (dBP) ble testet som ionpardanner som et alternativ til heptansulfonsyre da denne har vist seg å være uforlikelig med plasma. En ionpardanner som var negativt ladet i alle pH-områder og dannet et hydrofobt kompleks med peptidene ville være det mest ideelle. dBP er svært dårlig løselig i pH<4 og gir ekstremt sure løsninger uten en sterk buffer til stede. For å bufre denne løsningen ble det valgt 100mM citratbuffer:

- 2,941 g trinatriumcitrat dihydrat ble veid inn og løst i ca 80 ml destillert vann. Denne løsningen ble titrert med 0,2M HCl til pH~4,50 og etterfylt med vann til 100 ml.
- 50µl dBP ble løst i 5ml buffer slik at konsentrasjon av dBP ble 50mM, pH~3,87.

Donorfase bestod av 250 µl peptidblanding (20 µg/ml) og 750 µl (100mM citratbuffer, 50mM dBP), pH~3,87. LPME ble utført med 0,01M HCl (pH~2) som akseptorfase og *n*-oktanol som organisk fase.

5.5.5.1 Effekt av dBP-konsentrasjon på utbytte

Ulike konsentrasjoner av dBP i en 100mM citratbuffer ble testet. Det ble veid inn 1,475 g trinatriumcitrat dihydrat som ble løst i ca 25 ml destillert vann. Løsningen ble så titrert til pH~4,58 med 0,2M HCl og etterfylt med vann til 50 ml. Dibutylfosfat ble deretter løst i bufferen i forholdene som er angitt i tabell 5-12.

Tabell 5-12: Dibutylfosfat som ionpardanner i forskjellige konsentrasjoner

Konsentrasjon, dBP	Volum, dBP	Volum, 100mM citratbuffer (pH~4,58)	pH etter tils. av dBP
0mM	0µl	5,00ml	4,58
5mM	5µl	5,00ml	4,40
25mM	25µl	4,98ml	4,18
50mM	50µl	4,95ml	3,70
75mM	75µl	4,93ml	3,38
100mM	100µl	4,90ml	3,22

750 µl av hver konsentrasjon ble blandet med 250 µl peptidblanding (20 µg/ml) til en peptidkonsentrasjon i donorfase på 5 µg/ml. LPME ble utført med 0,01M HCl (pH~2) som akseptorfase og *n*-oktanol som organisk fase.

5.5.6 pH i akseptorfase

Senking av pH i akseptorfase vil trolig føre til at likevekten mellom peptid-heptansulfonsyre-komplekset og hydrogen-heptansulfonsyrekomplekset som er beskrevet i kapittel 4.3.1, blir forskøvet mot sistnevnte kompleks i akseptorfasen. Dette betyr at peptidene lettere blir løsrevet fra komplekset i kontaktpunktet mellom organisk fase og akseptorfase når det er stort overskudd av H^+ -ioner i akseptorfasen. Transporten av peptidene fra organisk fase til akseptorfase blir på denne måten mer effektiv. pH i akseptorfasen ble senket til pH~1 ved at 0,1M HCl ble benyttet som akseptorfase. Donorfasene bestod av peptider med en sluttkonsentrasjon i donorfasen på 4 $\mu\text{g/ml}$, 50mM $C_7SO_3^-$ og henholdsvis 0,01M HCl (pH~2), 0,1mM HCl (pH~3) og 0,3mM HCl (pH~3,66). LPME ble utført med *n*-oktanol som organisk fase i alle forsøkene.

5.5.7 Organisk fase

Alkoholer med ulike kjedelengder, samt dodecylacetat og dihexyleter, ble testet som mulige organiske faser i LPME av peptider. Studier har vist at *n*-oktanol fungerer godt som organisk fase i et trefase LPME-system [21, 37]. *n*-oktanol hadde imidlertid en tendens til å blakke donorfase slik at denne fasen ikke kunne analyseres. Dessuten er *n*-oktanol dårlig egnet som organisk fase i LPME i plasma. Tidligere forsøk har vist at dodecylacetat og dihexyleter fungerer tilfredsstillende som organisk fase i LPME i plasma [17, 18]. Det var imidlertid usikkert om disse fasene kunne være like gode når det ble benyttet et ionpardanner i transporten over membranen.

Tabell 5-13 gir en oversikt over betingelsene som ble benyttet under ekstraksjonene med de ulike organiske fasene. Forsøkene med alkoholene som organisk fase ble utført med pH~2 i akseptorfase og pH~3,7 i donorfase. Forsøkene med dodecylacetat og dihexyleter ble utført med pH~1 i akseptorfase og pH~3 i donorfase. Disse forskjellene i akseptorfase og donorfase oppstod på grunnlag av forsøk som ble utført mellom de to rekkene. Det ble der funnet mer optimale ekstraksjonsforhold i akseptor- og donorfase.

Tabell 5-13: Variasjoner i organisk fase

Organisk fase	Donorfase	Akseptorfase
Heksanol	0,3mM HCl, 50mM C ₇ SO ₃ ⁻ , peptid	0,01M HCl
1-heptanol	0,3mM HCl, 50mM C ₇ SO ₃ ⁻ , peptid	0,01M HCl
1-oktanol	0,3mM HCl, 50mM C ₇ SO ₃ ⁻ , peptid	0,01M HCl
1-nonanol	0,3mM HCl, 50mM C ₇ SO ₃ ⁻ , peptid	0,01M HCl
1-dekanol	0,3mM HCl, 50mM C ₇ SO ₃ ⁻ , peptid	0,01M HCl
Dodecylacetat	0,001M HCl, 50mM C ₇ SO ₃ ⁻ , peptid	0,1M HCl
Dihexyleter	0,001M HCl, 50mM C ₇ SO ₃ ⁻ , peptid	0,1M HCl

5.6 Plasma

5.6.1 Innledende forsøk

De foregående forsøkene med LPME av angiotensiner i vann viste at ekstraksjonen fungerer optimalt med 0,1M HCl (pH~1) som akseptor, *n*-oktanol som organisk fase og en donorfase med 0,001M HCl og 50mM heptansulfonsyre ($C_7SO_3^-$), pH~3,0. Disse forholdene dannet utgangspunktet for LPME av angiotensiner i plasma. Denne matriksen har imidlertid en kraftig bufferkapasitet på pH~7,4 [22]. Denne kapasiteten måtte derfor brytes for å få optimal pH i donorfase. Dette skulle kombineres med en ionpardannerkonsentrasjon på 50mM $C_7SO_3^-$ i plasma. En rekke forsøk ble utført med forskjellige kombinasjoner av pH, konsentrasjon av heptansulfonsyre og fortynning av plasma.

5.6.1.1 Test av utfelling i plasma med HCl og $C_7SO_3^-$

Dersom pH i plasma senkes, vil plasmaproteinene bli netto positivt ladet. Tilsetning av $C_7SO_3^-$ til surgjort plasma kan føre til proteinfelling fordi ionpardanneren fungerer som et proteinfellingsreagens. For bekrefte eller avkrefte denne teorien ble det utført 6 forsøk hvor plasma ble tilsatt en blanding av syre i forskjellige konsentrasjoner og ionpardanner. De ulike konsentrasjonene med HCl skulle indikere hvor sur plasma måtte være før utfelling med ionpardanneren fant sted. I prøve 1 - 5 ble plasma tilsatt en løsning med 50mM heptansulfonsyre og forskjellige konsentrasjoner HCl som beskrevet i tabell 5-14. Prøve 6 ble tilsatt vann.

Tabell 5-14: Utfelling i plasma med HCl og $C_7SO_3^-$

Prøve	Volum plasma (µl)	HCl- og $C_7SO_3^-$ - konsentrasjon	Volum HCl- og $C_7SO_3^-$ - løsning (µl)	pH i HCl- og $C_7SO_3^-$ -løsning
1	300	0,1M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	450	1,17
2	300	0,01M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	450	2,0
3	300	0,001M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	450	3,01
4	300	0,0001M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	450	4,27
5	300	0,00003M HCl, 50mM $C_7SO_3^-$	450	4,91
6	300	0M HCl, 0mM $C_7SO_3^-$	450	-

5.6.1.2 Justering av pH

For å kunne utføre LPME i plasma med sur pH i donorfasen, var det viktig å bestemme hvor mye HCl som måtte tilsettes før bufferkapasiteten var brutt og pH lå på ønsket nivå (pH~3). En plasmaprøve på 1 ml ble tilsatt 0,2M HCl i små volum, 50 µl om gangen. pH ble målt med pH-papir etter hver tilsetning.

5.6.1.3 Konstant konsentrasjon av ionpardanner, justering av pH

LPME av angiotensiner er avhengig av en ionpardanner i donorfasen. LPME i vann viste at optimal konsentrasjon av heptansulfonsyre er 50mM. Forsøkene i 5.6.1.1 indikerte at ionpardanneren i denne konsentrasjonen er uforlikelig med sur plasma. Det var derfor viktig å bestemme en grense for hvor lav pH i plasma kunne være før det ble utfelling når konsentrasjonen av heptansulfonsyre var konstant 50mM. Dette ble gjort ved at en plasmaprøve på 1ml ble tilsatt 1 ml 100mM $C_7SO_3^-$. Deretter ble 0,2M HCl tilsatt porsjonsvis til løsningen ble varig blakket. pH ble målt med pH-papir etter hver tilsetning.

5.6.1.4 Konstant pH, justering av ionpardanner-konsentrasjon

Det skulle bestemmes en grense for hvor mye heptansulfonsyre som kunne tilsettes plasma med ønsket pH uten at en proteinfelling fant sted. Effekten av ionparkonsentrasjon på utfelling ble testet ved pH 3,5 i plasma. pH~3,5 ble oppnådd ved å tilsette 200µl 0,2M HCl til 500µl plasma. Til denne løsningen ble det tilsatt 100µl 100mM $C_7SO_3^-$ i to omganger.

Dersom plasma ble fortynnet med vann før tilsetning av saltsyre og heptansulfonsyre ville den trolig tåle høyere konsentrasjon av $C_7SO_3^-$ ved lav pH. En plasmaprøve på 250 µl ble tilsatt 250 µl H_2O og 150 µl 0,2M HCl slik at pH ble ca 3,5. Deretter ble 100mM $C_7SO_3^-$ tilsatt porsjonsvis, 50 µl hver gang, til løsningen ble permanent blakket.

Plasma ble ytterligere fortynnet ved at 250 µl plasma ble tilsatt 500 µl H_2O og 150 µl 0,2M HCl slik at pH ble 3,5. 100mM $C_7SO_3^-$ ble tilsatt porsjonsvis, 50 µl hver gang, til løsningen ble permanent blakket.

5.6.2 Proteinfellingsreagenser

Det synes å være klart at plasmaproteinene er en stor problemkilde når det gjelder LPME i plasma. Dersom proteinene i plasma ble felt ut før tilsetning av ionpardanner ville det antakelig bli enklere å tilsette dette i tilstrekkelige mengder uten at det ble dannet bunnfall. Studier som er gjort av effekten til forskjellige proteinfellingsreagenser har vist at blant annet 10 % w/v trikloreddiksyre (TCA), 5 % w/v *m*-fosforsyre og 10 % w/v sinksulfat (ZnSO_4) i kombinasjon med NaOH er godt egnet til proteinfelling [36]. Det er også beskrevet proteinfelling med ren sinksulfatløsning [40]. De tre fellingsreagensene i studiene hadde tilnærmet lik effekt når det gjelder hvor stor prosentandel av plasmaproteinene som ble felt ut. Forsøkene viste også at forholdet mellom plasma og proteinfellingsreagens hadde innvirkning på effekten. Det ble derfor gjort forsøk med de tre fellingsreagensene for å se om de kunne fungere i kombinasjon med LPME-betingelsene.

5.6.2.1 Trikloreddiksyre (TCA)

En 10 % w/v TCA-løsning ble laget ved at 5,0 g TCA ble veid inn og løst i 50 ml H_2O . Denne løsningen var svært sur, pH ble målt til 0.

TCA uten buffer

-TCA-løsningen ble tilsatt plasma i forholdet 0,5:1 i et sentrifugerør. Blandingen ble deretter sentrifugert på sentrifuge i 10 min, og supernatanten ble fordelt i tre prøveglass. pH i supernatanten var ca 1,5.

-Det ble tilsatt 100mM C_7SO_3^- til en del av supernatanten for å se om det ble utfelling.

Den lave pH i supernatanten måtte justeres opp til pH~3. Dette ble gjort både med 0,1M og 1M NaOH for å bestemme hvilken konsentrasjon som egnet seg best i pH-justeringen.

-En løsning med 0,1M NaOH ble laget ved at 0,40 g NaOH ble løst i 100 ml destillert vann.

-Løsningen med 0,1M NaOH ble titrert med en del av supernatanten til pH~3.

-En løsning med 1M NaOH ble laget ved at 0,7947 g NaOH ble veid inn og løst i 20 ml destillert vann.

-Løsningen med 1M NaOH ble titrert med en del av supernatanten til pH~3.

Det var vanskelig å ha god pH-kontroll når natriumhydroksid ble benyttet til pH-titrering i supernatanten. Det skulle derfor testes hvorvidt en buffer kunne utøve bedre kontroll med pH når TCA var tilstede.

TCA med fosfatbuffer

Forsøkene ble utført ved at en løsning med natriumdihydrogenfosfat (NaH_2PO_4) ble tilsatt løsningen med TCA under konstant pH-måling.

-En 1M fosfatbuffer ble laget ved at 6,8995g NaH_2PO_4 ble veid inn og løst i 50ml destillert vann, pH~4,5.

-Løsningen med 1M NaH_2PO_4 ble tilsatt 10 % TCA litt etter litt mens pH hele tiden ble målt med pH-papir

TCA med acetatbuffer

-Det ble laget en 100mM acetatbuffer ved at 286 μl eddiksyre (CH_3COOH) ble tilsatt destillert vann i en 50 ml målekolbe og etterfylt med vann til 50 ml.

-Deretter ble 0,4102 g natriumacetat (CH_3COONa) løst i 50 ml destillert vann.

-Acetatløsningen ble titrert med eddiksyreløsningen til pH~4,61.

-Acetatbufferen med pH~4,61 ble tilsatt 10 % TCA i forholdet 25:3.

5.6.2.2 Sinksulfat

En 10 % w/v sinksulfatløsning ble laget ved at 2,0 g sinksulfat heptahydrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) ble veid inn og løst i 20 ml destillert vann, pH>5.

En plasmaprøve på 2,0 ml ble først tilsatt 1,0 ml 10 % ZnSO_4 slik at sinkionene kunne hekte seg på de negative ladningene på proteinene. Deretter ble 1,0 ml 0,5M NaOH blandet med plasma og sinksulfat for å slukke de positive ladningene. Proteinene dannet da et hydrofobt kompleks med sinkioner som ble felt ut. $\text{Zn}(\text{OH})_2$ er lite løselig i vann, $K_{\text{sp}}=3.8 \times 10^{-16}$ [41]. Blandingen ble mikset på vortexmikser i 20 s, satt på henstand i 20 min og sentrifugert i 10 min. pH i supernatanten ble justert med 1M HCl.

Forholdet mellom plasma og fellingsreagens skulle endres. En plasmaprøve på 0,5 ml ble tilsatt 0,5 ml 10 % ZnSO_4 , deretter 0,5 ml 0,5M NaOH. Blandingen ble mikset på vortexmikser i 20 s og sentrifugert i 15 min. pH i supernatanten ble justert med 1M HCl.

Det skulle testes om proteinfelling ble mer effektiv ved å endre på tilsetningsrekkefølgen av sinksulfat og natriumhydroksid. En plasmaprøve på 0,5 ml ble først tilsatt 0,5 ml 0,5M NaOH, deretter 0,5 ml 10 % ZnSO_4 . Blandingen ble mikset på vortexmikser i 20 s og sentrifugert i 15 min. pH i supernatanten ble justert med 1M HCl og 0,5M NaOH.

Ettersom positive sinkioner kan danne uløselige komplekser med en rekke anioner, var det også en mulighet for at sink ville hekte seg på heptansulfonsyre og dermed inaktivisere ionpardanneren. Dette ble derfor testet ut ved å gjøre forskjellige fellingsforsøk i vann. Dessuten var det ønskelig å fastslå om angiotensinene ble felt ut med sinksulfat. Prøvene ble opparbeidet som vist i tabell 5-15. Donorfase og akseptorfase ble analysert for hver prøve.

Tabell 5-15: Sinksulfat som fellingsreagens i vann

Prøve 1: Vann	Prøve 2: Vann	Prøve 3: Vann	Prøve 4: Vann
+ Zn^{2+}	- Zn^{2+}	+ Zn^{2+}	- Zn^{2+}
+ 0,5M NaOH	+ 0,5M NaOH	+ 0,5M NaOH	+ 0,5M NaOH
+ peptidblanding	+ peptidblanding	Sentrifugering	
Sentrifugering		+ peptidblanding	+ peptidblanding
pH-justering av supernatant til pH~3 med 0,2M HCl		pH-justering av supernatant til pH~3 med 0,2M HCl	
+ C_7SO_3^-	+ C_7SO_3^-	+ C_7SO_3^-	+ C_7SO_3^-
Sentrifugering		Sentrifugering	
LPME	LPME	LPME	LPME

5.6.2.3 *m*-fosforsyre

En løsning på 5 % *m*-fosforsyre ble laget ved at 2,5 g *m*-fosforsyre ble veid inn og løst i 50 ml H₂O, pH~1.

Felling med m-fosforsyre uten buffer

En plasmaprøve på 2 ml ble tilsatt 2 ml 5 % *m*-fosforsyre. Blandingen ble mikset på vortex-mikser i 20 s og sentrifugert i 10 min. pH i supernatanten var ca 2,5, og denne ble justert til pH~3 med 0,5M NaOH.

m-fosforsyre med fosfatbuffer

Proteinfelling med *m*-fosforsyre førte til lavere pH i supernatanten enn det som var målet i donorfasen (pH~3-3,5). Dersom en buffer skulle stabilisere pH i supernatanten, måtte den også kunne kontrollere pH i en ren vannløsning. Fosfatbuffer ble derfor benyttet i et forsøk på å stabilisere pH i en *m*-fosforsyreløsning hvor plasma var erstattet med vann.

-Det ble laget en 100mM fosfatløsning ved at 0,6901 g natriumdihydrogenfosfat (NaH₂PO₄) ble veid inn og løst i 50 ml destillert vann, pH~4,5.

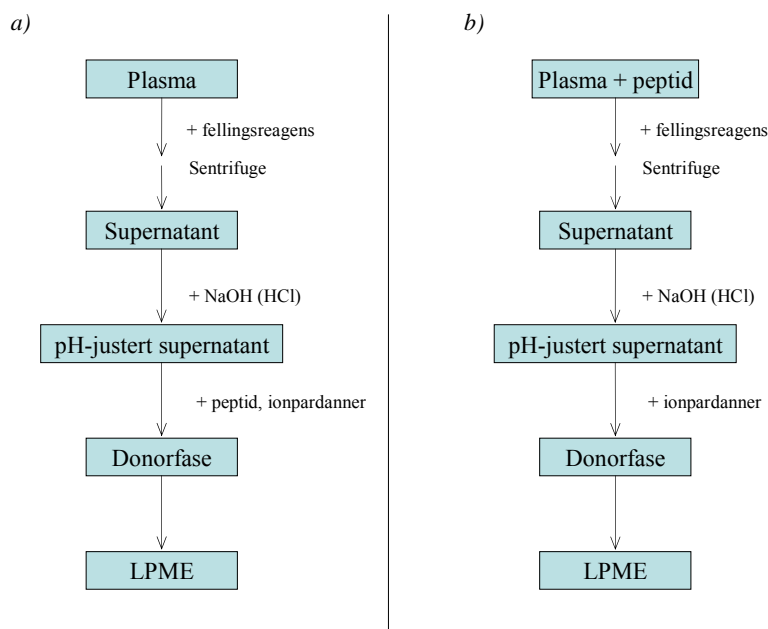
-En løsning med 5 ml 5 % *m*-fosforsyre ble blandet med 5 ml vann, pH~1,2. Deretter ble 100mM H₂PO₄⁻ (pH~5) tilsatt litt etter litt under konstant pH-måling.

-En løsning med 5 ml 5 % *m*-fosforsyre ble blandet med 5 ml vann, pH~1,2. Deretter ble en løsning med 1M NaOH tilsatt litt etter litt under konstant pH-måling til pH~3,09.

-En løsning med 5 ml 5 % *m*-fosforsyre ble blandet med 5 ml vann. Deretter ble det tilsatt 1 ml 1M NaOH til pH~2,48. Så ble 3 ml 100mM H₂PO₄⁻ tilsatt, pH~2,61. Løsningen ble videre titrert med 1M NaOH for å undersøke om den var stabil med fosfatbufferen.

5.6.3 LPME i plasma

Etter at det var utviklet metoder for proteinfelling i plasma og pH-justering av supernatanten, skulle denne tilsettes ionpardanner og testes som donorfase i LPME.



Figur 5-1: Fremgangsmåte for LPME i plasma med tilsetning av peptid før (a) og etter (b) proteinfelling

Plasmaprøvene ble opparbeidet som vist i figur 5-1. Rekkefølgen i figur 5-1 a) og 5-1 b) er forskjellig idet peptid ble tilsatt før og etter proteinfelling og pH-justering. Dette ble gjort for å bestemme om, og eventuelt hvor mye peptid som felles ut i proteinfellingsprosessen. Prøvene ble etter tilsetning av proteinfellingsreagens mikset på vortex-mikser i 20 sek etterfulgt av sentrifugering i 10 min. Supernatanten ble overført til andre prøveglass, hvor det ble foretatt pH-justering og tilsetning av ionpardanner. Alle ekstraksjonene ble utført med 0,1M HCl som akseptorfase og *n*-oktanol som organisk fase. Ristetid var 45 min. Akseptorfasen ble overført til prøvebeholdere ved hjelp av en løsning med 5mM $C_7SO_3^-$ og 10mM HCOOH som beskrevet i kapittel 5-2 (s.28). Det ble tilsatt 20 μ l 0,1M NaOH for å heve pH til ~2. Akseptorfasene i disse forsøkene ble analysert på HPLC under betingelser angitt i kapittel 5-3 dersom ikke annet er nevnt.

5.6.3.1 TCA som fellingsreagens

Det ble brukt en løsning på 10 % TCA til proteinfelling som beskrevet i 5.6.2.1. TCA ble tilsatt plasma forsiktig langs kanten av et sentrifugerør mens det ble holdt litt på skrå i et ultralydbad. Dette ble gjort for å få en jevn utfelling. Dersom proteinene ble felt ut for raskt kunne det muligens føre til at angiotensinene ble kapslet inn av proteinkompleksene og forsvant fra plasma etter sentrifugeringen.

Det ble fokusert på å redusere tilsatt mengde væske til plasma slik at den ble minst mulig fortynnet:

- Volumet på peptidblandingen ble redusert ved at konsentrasjonen på blandingen ble økt fra 2,5 µg/ml til 20 µg/ml
- Forholdet mellom TCA og plasma ble variert fra 0,5:1, 0,75:1 til 1:1 mens andre forhold ble holdt konstante (konsentrasjon av peptider i plasma 3 µg/ml, 50mM $C_7SO_3^-$ 1M NaOH, pH~3 i supernatanten)
- Mengde NaOH som ble brukt til pH-justering ble forsøkt redusert ved å bruke en mer konsentrert NaOH-løsning

5.6.3.2 Sinksulfat som fellingsreagens

Proteinene ble felt med 10 % $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ og 0,5M NaOH som beskrevet i 5.6.2.2. Mengde sinksulfatløsning i forhold til plasma ble variert fra 1:1, 1,5:1 til 2:1. Prøvene ble opparbeidet som vist i figur 5-1, 1M HCl ble brukt til å justere pH til ca 3. Konsentrasjon av ionpardanner var 50mM.

5.6.3.3 *m*-fosforsyre som fellingsreagens

Det ble brukt en løsning på 5 % *m*-fosforsyre til proteinfelling som beskrevet i 5.6.2.3. Forholdet mellom *m*-fosforsyre og plasma ble variert fra 0,5:1, 0,75:1 til 1:1 mens de andre betingelsene ble holdt konstante (konsentrasjon av peptider i plasma 3µg/ml, 50mM $C_7SO_3^-$, 0,5M NaOH, pH~3 i supernatanten).

5.6.4 LPME i plasma med LC-MS-analyse

LC-MS til analyse av akseptorfase etter LPME i plasma ble introdusert på grunn av instrumentets følsomhet. Dersom LPME skal kunne brukes til deteksjon av endogene peptider med konsentrasjon 50 pg/ml, må metodens deteksjonsgrense være lav.

5.6.4.1 Ulike konsentrasjoner av angiotensin I, II og III

Det skulle undersøkes hvor lave plasmakonsentrasjoner av angiotensiner metoden var i stand til å detektere. Dette ble gjort ved at fire plasmaprøver på 1,5 ml ble tilsatt henholdsvis 3, 6, 15 og 30 µl av en løsning på 2,5 µg/ml angiotensin I, II og III slik at plasmakonsentrasjonen ble 5, 10, 25 og 50 ng/ml. Hver prøve ble tilsatt 750 µl 10 % TCA og opparbeidet videre som vist i figur 5-1 a). Løsningen ble sentrifugert i 10 min med 80 % hastighet. pH i 1,5 ml supernatant ble justert til ~3 med 1,3 ml 0,1 M NaOH. En løsning med 0,1 ml 500mM heptansulfonsyre ble tilsatt 0,9 ml pH-justert supernatant slik at konsentrasjonen av ionpardanner ble 50mM. LPME ble utført i denne løsningen med 0,1 M HCl som akseptorfase og *n*-oktanol som organisk fase. Ekstraksjonsenheten stod på vibratoren og ble ristet i 45 min. Akseptorfase ble overført til prøvebeholdere ved hjelp av 50 µl av en løsning på 5 mM heptansulfonsyre og 10 mM maursyre som beskrevet i kapittel 5.2. pH i den fortynnede akseptorfase ble hevet til ~3 med 20 µl 0,1M NaOH. Injisert volum i LC-MS var 50 µl. LC-MS-metoden som ble benyttet er beskrevet i kapittel 5.4.

5.6.4.2 LPME i plasma med og uten ACE-hemmer

Tidligere forsøk med LPME i plasma viste at utbytte av angiotensin II ble relativt mye høyere enn utbytte av angiotensin I og III ved tilsetning av peptid før proteinfelling sammenlignet med tilsetning av peptid etter felling. Dette kan skyldes at angiotensin converting enzyme (ACE) metaboliserer angiotensin I til angiotensin II dersom peptidene tilsettes før proteinfelling. Ved å tilsette en ACE-hemmer til plasma før tilsetning av peptid og proteinfellingsreagens, vil denne prosessen trolig hemmes. LPME ble utført i plasmaprøver med og uten ACE-hemmer for å detektere en eventuell forskjell. Captopril ble valgt som ACE-hemmer. Vanlig plasmakonsentrasjon av denne hemmeren etter inntak på 50 mg er ca 300 ng/ml [42]. For å være sikker på at det var tilstrekkelige mengder med ACE-hemmer ble captopril tilsatt plasma til en konsentrasjon på 2 mg/ml.

-Det ble laget en løsning av captopril på 50 mg/ml ved at 0,5 g captopril ble løst i 10 ml destillert vann.

-En plasmaprøve på 4,7 ml ble tilsatt 0,2 ml 50 mg/ml captopril, deretter 0,1 ml 2,5 µg/ml peptidblanding til en peptidkonsentrasjon i plasma på 50 ng/ml.

-En plasmaprøve på 4,9 ml ble tilsatt 0,1 ml 2,5 µg/ml peptidblanding til en peptidkonsentrasjon i plasma på 50 ng/ml.

Begge plasmaprøvene ble tilsatt 2,5 ml 10 % TCA-løsning. Prøvene ble videre opparbeidet som vist i figur 5-1 a). pH i 4,5 ml supernatant ble justert til ~3 med 4,0 ml 0,1M NaOH. Donorfasene bestod av 900 µl pH-justert supernatant og 100 µl 500mM $C_7SO_3^-$. LPME ble utført med 0,1M HCl som akseptorfase og *n*-oktanol som organisk fase i alle forsøk. Akseptorfasene ble overført til prøvebeholderene ved hjelp av 10mM HCOOH. Deretter ble 20 µl 0,1M NaOH tilsatt for å heve pH til ~2. Prøvene ble analysert på LC-MS.

5.6.4.3 Deteksjon av endogent angiotensin II

Endogen konsentrasjon av angiotensin II er som tidligere nevnt 10-60 pg/ml. LPME-metoden har vist at det er mulig med en oppkonsentrering i plasma på minimum 5 ganger (tabell 6-13, s.80). Dette betyr at dersom plasmakonsentrasjonen er 50 pg/ml, skal konsentrasjonen av angiotensin II i akseptorfasen etter LPME teoretisk kunne bli 250 pg/ml. Akseptorfasen ble i disse analysene fortynnet til 75 µl, og 50 µl av dette ble injisert på LC-MS. Dette tilsvarer en teoretisk injisert mengde på 3,3 pg angiotensin II. Med en deteksjongrense på 0,05 ng/ml (2,5 pg på kolonnen) er muligheten tilstede for å kunne påvise endogent angiotensin II.

En plasmaprøve på 2,5 ml ble tilsatt 1,25 ml 10 % TCA og videre opparbeidet som vist i figur 5-1 a). pH i supernatanten ble justert til ~3 med 0,1M NaOH. LPME ble utført med 900 µl pH-justert supernatant og 100 µl 500mM $C_7SO_3^-$ som donorfase. Akseptorfase var 0,1M HCl og organisk fase var *n*-oktanol.

5.7 Validering

5.7.1 Stabilitet

Stabiliteten til angiotensinene ble testet med hensyn på pH, lys og temperatur. Det ble laget en løsning med 5 µg/ml angiotensin I, II og III i 0,01M HCl, pH~2. Det ble analysert fire paralleller umiddelbart etter tilberedning. Resten av løsningen ble satt på henstand i lys og ved romtemperatur i 24 timer før ytterligere fire paralleller ble analysert.

5.7.2 Linearitet

HPLC-metodens linearitet ble testet i området 0,1 µg/ml-75 µg/ml for angiotensin I, II og III. Disse grensene tilsvarer et utbytte på 0,2 % (0,1 µg/ml) og 135 % (75 µg/ml) i LPME. Linearitetsområdet dekker derfor både lave og høye utbytter i ekstraksjonene. Det ble laget en standardkurve for hvert angiotensin. Standardkurvene ble laget av 8 punkter med 3 paralleller for hvert punkt. Korrelasjonskoeffisienten ble beregnet for hver kurve.

LC-MS-metodens linearitet ble testet i området 2,5 ng/ml-25 ng/ml for angiotensin I, II og III. Forventet utbytte i plasma med den oppkonsentreringen som var kjent fra de tidligere plasmastudiene, dekkes av dette konsentrasjonsområdet. Det ble laget en fortynningsrekke med utgangspunkt i en angiotensinløsning på 2,5 µg/ml. En standardkurve for angiotensin II og III ble laget. Hver kurve bestod av 4 punkter med 3 paralleller for hvert punkt. Korrelasjonskoeffisienten ble beregnet for hver kurve. Angiotensin I gav dårlige signaler ved samtlige konsentrasjoner som ble analysert. Det ble derfor ikke laget noen standardkurve for dette peptidet.

5.7.3 Repeterbarhet

HPLC-metodens repeterbarhet ble testet. Dette ble gjort ved at 3 paralleller med en løsning av angiotensin I, II og III (5 µg/ml) ble analysert i samme analyserekke. Relativt standardavvik (RSD) for topphøyde og retensjonstider ble beregnet. I tillegg ble det beregnet RSD for topphøyde og retensjonstider etter analyse av 5 µg/ml angiotensin I, II og III utført på 4 ulike dager.

5.8 Beregning av oppkonsentreringsfaktor og utbytte

Oppkonsentreringsfaktoren (EF) defineres som forholdet mellom endelig peptidkonsentrasjon i akseptorfasen, $C_{a, \text{endelig}}$, og initiell konsentrasjon av peptid, $C_{p, \text{initiell}}$, i prøven:

$$EF = C_{a, \text{endelig}} / C_{p, \text{initiell}}$$

Oppkonsentreringsfaktoren beregnes ved bruk av topphøyde til prøven i forhold til topphøyde til referanseløsning.

Utbytte defineres som prosentandel av prøvens initielle peptidmengde ($n_{p, \text{initiell}}$) som har blitt ekstrahert over til akseptorfasen ved endt ekstraksjon ($n_{a, \text{endelig}}$):

$$\begin{aligned} \text{Utbytte} &= (n_{a, \text{endelig}} / n_{p, \text{initiell}}) \cdot 100 \% \\ &= (V_a / V_p) \cdot EF \cdot 100 \%, \end{aligned}$$

der V_a og V_p er volum av henholdsvis akseptorløsning og prøveløsning.

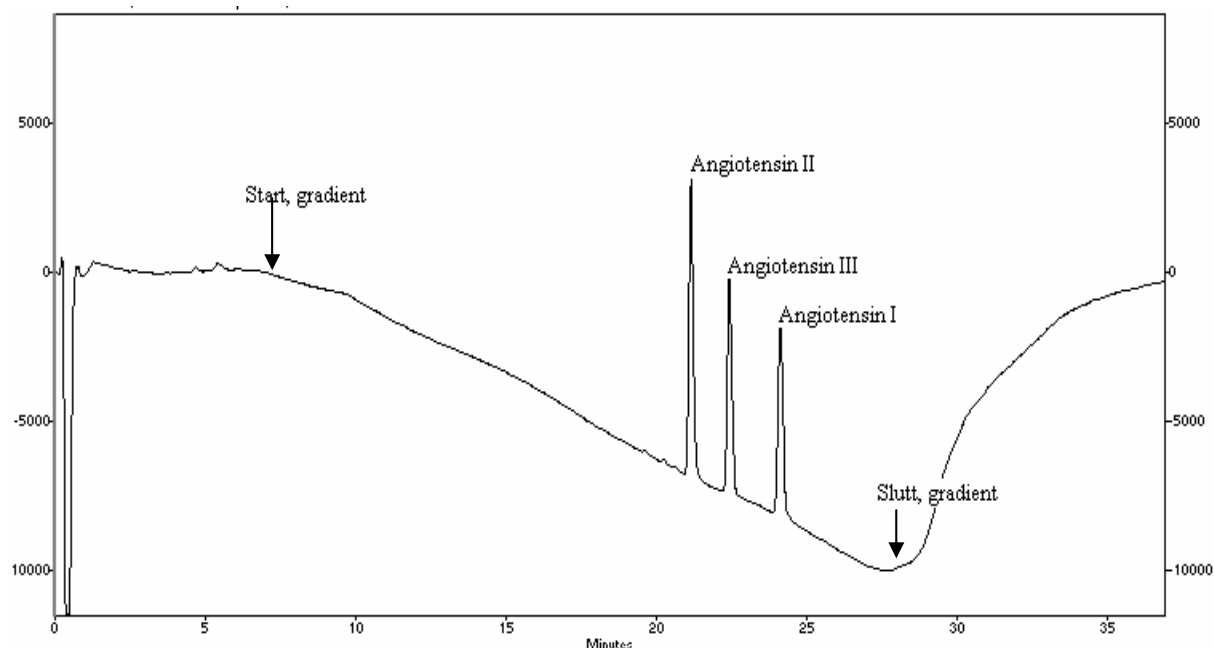
6 RESULTATER OG DISKUSJON

6.1 HPLC- og LC-MS-metode

Retensjonstidene til angiotensin I, II og III var ukjente, og det ble derfor gjort en rekke forsøk for å utvikle en optimal HPLC-metode som kunne grunnlinjeseperere angiotensinene og som samtidig ikke tok for lang tid. Ved separasjon av ioniske forbindelser som peptider er det viktig å ha kontroll på pH, og mobilfasen bør derfor inneholde en pH-regulerende komponent. Maursyre ble i dette tilfellet valgt slik at peptidene ble netto positivt ladet. En ionpardanner i mobilfasen kan danne hydrofobe komplekser med analyttene. Dette vil gi bedre retensjon av analyttene i et omvendt fase-system. Angiotensin I, II og III er som nevnt netto positivt ladet ved lav pH, og heptansulfonsyre som er negativt ladet ved de aktuelle pH-verdiene ble foretrukket som ionpardanner.

Resultatet av den endelige HPLC-gradienten er vist i figur 6-1. Gradienten som vises i kromatogrammet er forskjøvet ca 5 min i forhold til gradienten som er vist i tabell 5-4 (s.29). Dette skyldes avstanden fra pumpene som styrer gradienten, til detektoren. Angiotensin I, II og III er grunnlinjeseperert, og kommer fra kolonnen godt innenfor tidsrommet hvor det går en gradient. Kurvens bratthet ble endret ved å regulere mengden av mobilfase B mens tiden det ble kjørt gradient var konstant. Reduksjon av sluttkonsentrasjonen av mobilfase B gav mindre bratt kurve. Dette førte til at avstanden mellom angiotensin I, II og III i kromatogrammet ble større, og de ble grunnlinjeseperert. Når grunnlinjeseperasjon var oppnådd, ble gradienttiden forlenget mens stigningstallet på kurven ble holdt konstant. Dette ble gjort for å unngå at peptidene ble eluert ut i overgangen mellom nedadgående og oppadgående kurve i slutten av gradienten som vist i figur 6-1.

Retensjonsrekkefølgen til peptidene i figur 6-1 stemmer godt overens med deres hydrofobisitet som er diskutert i kapittel 4.2.3 (s.14). Angiotensin I retarderes best på C18-kolonnen, og er følgelig det mest hydrofobe av de tre peptidene ved den pH som er i mobilfasen (~2,5). Angiotensin II er det mest hydrofile peptidet, dette fører til den korteste retensjonstiden på en hydrofob kolonne.



Figur 6-1: HPLC-gradient, peptidkonsentrasjon 5 µg/ml

Retensjonstidene til angiotensin I, II og III i tabell 6-1 er basert på den endelige gradienten som er vist i tabell 5-4.

Tabell 6-1: Retensjonstider i HPLC

Peptid	Retensjonstid (min)
Angiotensin I	24,6
Angiotensin II	21,6
Angiotensin III	22,9

I LC-MS er det ikke nødvendig at peptidene er grunnlinjeseperert da de, i tillegg til å skilles på kolonnen, også separeres etter deres masse/ladningsforhold. Det ble derfor ikke lagt like stor vekt på å separere peptidene i LC-MS som i HPLC.

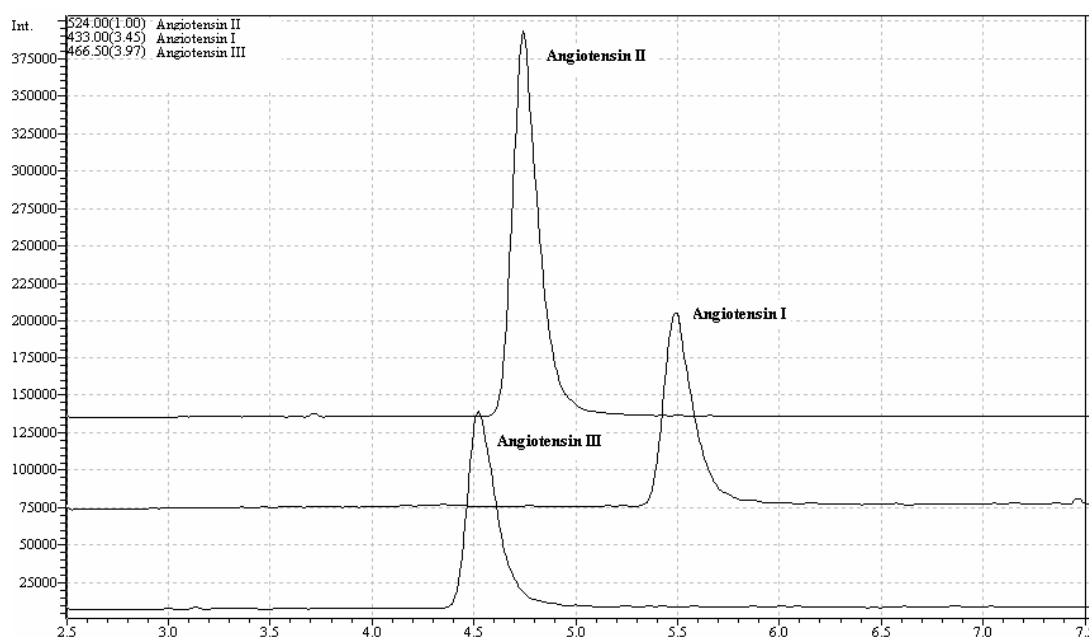
Selektiv ionemonitorering i positiv mode (SIM (+)) ble valgt som deteksjonsmetode fremfor fullt sveip da masse/ladningsforholdet (m/z) til angiotensinene er kjente. Tabell 6-2 viser retensjonstid, molekylvekt og m/z -verdier til de ulike angiotensinene. Signalene for m/z som gav høyest intensitet ble valgt når SIM skulle utføres. De foretrukne signalene er angitt i kursiv i tabell 6-2.

Tabell 6-2: Masse, masse/ladningsforhold og retensjonstider til angiotensin I, II og III

Peptid	Masse	m/z	Retensjonstid (min)
Angiotensin I	1297	1298 649,5 433	5,49
Angiotensin II	1046	1047 524 349,7	4,73
Angiotensin III	931	932 466,5 311,3	4,52

Mobilfasene som benyttes i LC-MS kan i motsetning til i HPLC ikke inneholde komponenter som er ikke-flyktige. Heptansulfonsyre måtte derfor utelates i mobilfase A. Maursyre med pH~2,5 stabiliserer pH i mobilfasen i det sure området slik at C18-kolonnen ikke skades. I tillegg fører den sure mobilfasen til at peptidene blir ionisert.

Injeksjonsvolum ble endelig satt til 50 µl, dette tilsvarer 250 pg på kolonnen ved injeksjon av en løsning på 5 ng/ml. Retensjonstidene til angiotensin I, II og III i tabell 6-2 er basert på peptider i vann analysert med gradienten i tabell 5-5 (s.30). Retensjonstidene var noe avvikende i analysen av akseptorfase i LPME-forsøkene i forhold til peptider løst i vann. Litt heptansulfonsyre i akseptorfase bidro til at peptidene kom senere fra kolonnen (ca 1 min). Kromatogrammet i figur 6-2 viser et utsnitt av SIM-kromatogrammene etter analyse av peptider løst i vann hvor gradienten i tabell 5-5 er benyttet.

**Figur 6-2: Analyse av angiotensin I, II og III (50 ng/ml) i LC-MS**

På grunn av dårlige og ustabile signaler fra angiotensin I og III ble det utviklet en ny metode for analyse av angiotensin II. Det ble foretatt SIM på tre masse/ladningsforhold for angiotensin II (1047, 524 og 349,7). Parallelt med disse målingene ble det målt kun på 349,7 da dette masse/ladningsforholdet gav høyest signal. Denne metoden økte følsomheten for angiotensin II slik at 0,05 ng/ml var detekterbart som vist i figur 6-3.



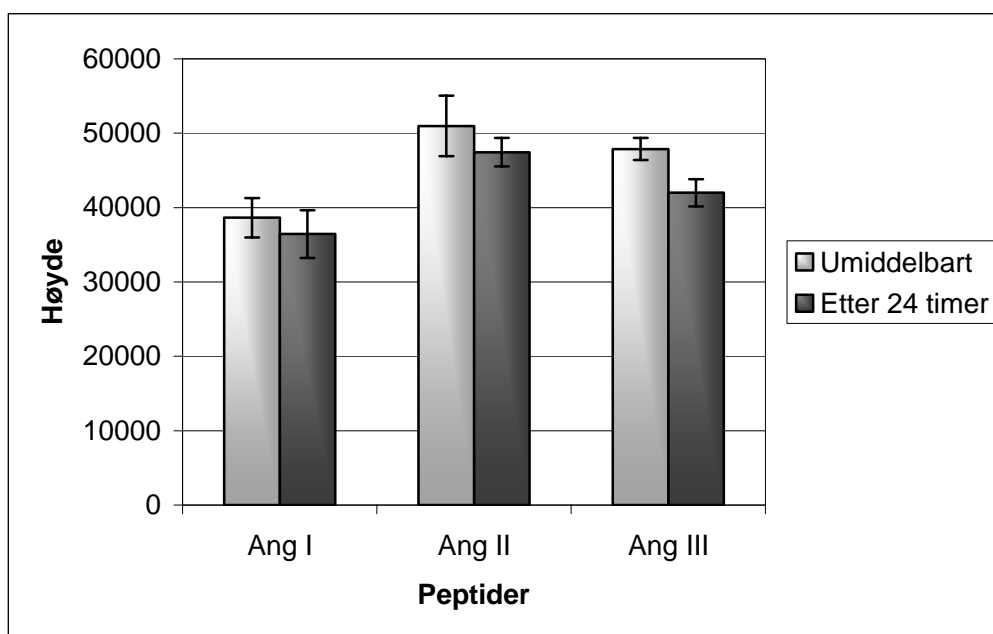
Figur 6-3: Utsnitt av kromatogram etter analyse av 0,05 ng/ml angiotensin II i vann

6.2 Validering

En analysemetode må valideres for å avgjøre om den er egnet til bruk på det feltet som den er laget for. Dette gjøres for å kvalitetssikre de resultatene analysen gir. HPLC-metoden og LC-MS-metoden ble validert med hensyn på linearitet, mens peptidene ble validert med hensyn på stabilitet. Relativt standardavvik (RSD) av signalene ble beregnet, både intra-day og inter-day.

6.2.1 Stabilitet

Det er viktig at angiotensinene er stabile under de forholdene de utsettes for. Lys, temperatur og pH er viktige faktorer som kan påvirke stabiliteten til peptidene. De siste akseptorfasene i en analyserekke kunne bli stående opp til 24 timer i lys og romtemperatur før de ble analysert. pH i disse fasene var imidlertid ≥ 2 , mens peptidenes stabilitet ble testet ved pH~1.



Figur 6-4: Degradering av angiotensin I, II og III

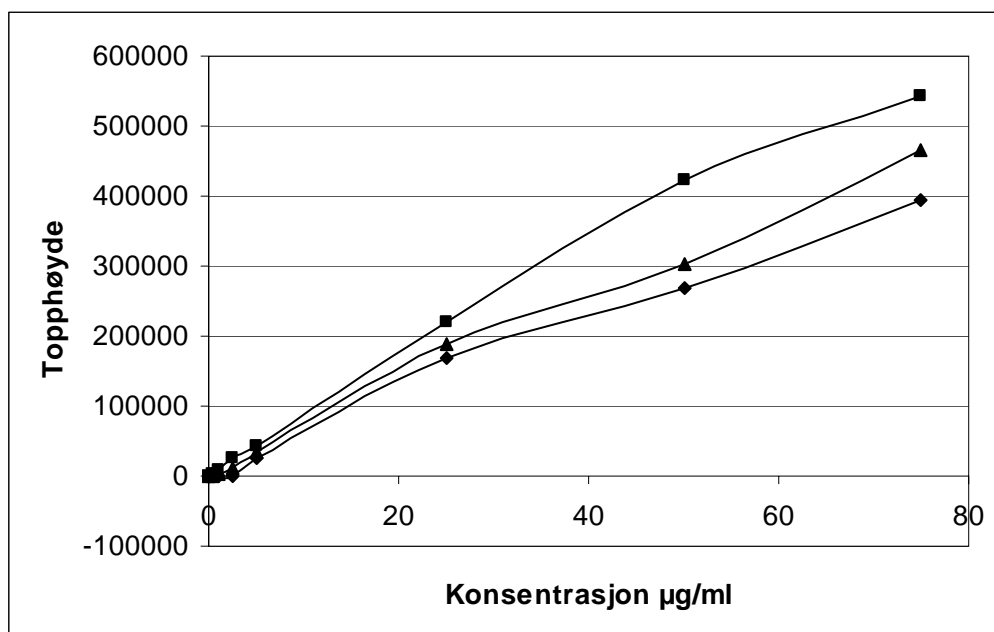
Figur 6-4 viser at angiotensinene kan degraderes når de utsettes for lav pH, lys og romtemperatur over flere timer. Prosentvis degradering er 5,7, 6,9 og 12,3 % for henholdsvis angiotensin I, II og III. Dette må imidlertid sees i sammenheng med standardavviket til analysene. Absolutt standardavvik er vist i figur 6-4. Standardavviket ved umiddelbar analyse av angiotensin I og II overlapper resultatene fra analysene etter 24 timer. Det kan derfor ikke med sikkerhet fastslås at noen nedbrytning av disse to peptidene har funnet sted. Analysene

av angiotensin III har liten usikkerhet, og det er ingen overlapp mellom resultatene fra umiddelbar analyse og analyse etter 24 timer. Dette peptidet blir derfor nedbrutt til en viss grad når det utsettes for romtemperatur, lys og lav pH (~ 1) over lengre tid. Det ideelle ville derfor være å analysere akseptorfasene umiddelbart etter ekstraksjon eller ved lav temperatur. Angiotensinene blir imidlertid ikke utsatt for pH lavere enn 2 over lengre tid. Nedbrytningen av angiotensin III ved pH ~ 1 anses derfor som ubetydelig for resultatene i oppgaven.

6.2.2 Linearitet

6.2.2.1 HPLC-metode

Linearitet er egenskapen metoden har til å gi standardkurver hvor responsen er en lineær funksjon av konsentrasjon innenfor et gitt konsentrasjonsområde. Dersom utbytte fra LPME skal kunne måles i HPLC, må analysemetoden være tilnærmet lineær innenfor det konsentrasjonsområdet hvor forventet utbytte ligger.



Figur 6-5: Linearitet til HPLC-metoden for angiotensin I (♦), II (■) og III (▲)

Figur 6-5 viser at HPLC-metoden er bortimot lineær for alle tre angiotensinene innenfor konsentrasjonsområdet 0,1-75 $\mu\text{g/ml}$. Topp høyden er en tilnærmet lineær funksjon av peptidkonsentrasjonen. Dette betyr at utbytter mellom 0,2 % og 135 % i LPME av angiotensin I, II og III kan bestemmes ved hjelp av topp høyden til en referanseløsning med denne metoden.

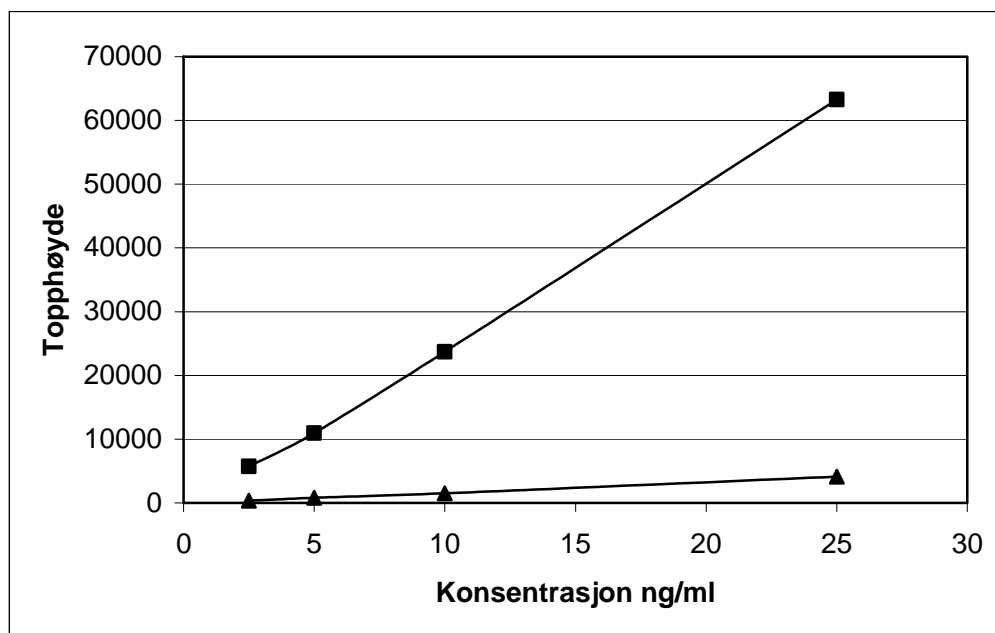
Regresjonslinjene og korrelasjonskoeffisientene til metoden er vist i tabell 6-3. I regresjonslinjen $y = ax + b$, er y responsen mens x er konsentrasjonen. Korrelasjonskoeffisientene, R , er lavere enn anbefalt (0,999) [35]. Disse verdiene aksepteres imidlertid i dette tilfellet, og metoden anses som lineær siden kvantifisering ikke er et overordnet mål i oppgaven.

Tabell 6-3: HPLC-metodens linearitet

Peptid	Regresjonslinje ($y=ax+b$)	Korrelasjons- koeffisient (R)
Ang I	$y=5405,4x-283,06$	0,9956
Ang II	$y=7551x+8247,5$	0,9948
Ang III	$y=6216,5x+1648,4$	0,9972

6.2.2.2 LC-MS-metode

Lineariteten til LC-MS-metoden ble testet i konsentrasjonsområdet 2,5-25 ng/ml.



Figur 6-6: Linearitet til LC-MS-metoden for angiotensin II (■) og III (▲)

Figur 6-6 viser kalibreringskurvene til angiotensin II og III i LC-MS-metoden. Kurvene er lineære innenfor konsentrasjonsområdet, dette bekreftes også av de høye korrelasjonskoeffisientene i tabell 6-4. Utbytte for angiotensin II og III i LPME kan derfor bestemmes med denne metoden ved hjelp av topphøyden fra analyse av referanseløsninger som ligger innenfor konsentrasjonsområdet.

Tabell 6-4: LC-MS-metodens linearitet

Peptid	Regresjonslinje ($y=ax+b$)	Korrelasjons- koeffisient (R)
Ang I	-	-
Ang II	$y=2580x-1496,2$	0,9996
Ang III	$y=167,3x-77,665$	0,9991

Angiotensin I gav meget ustabile signaler fra dag til dag, og det lot seg ikke gjøre å lage en standardkurve innenfor konsentrasjonsområdet med dette peptidet. Tidligere forskning har vist at angiotensiner adsorberer på glass [30]. Adsorpsjon til prøveglassene kan være en medvirkende årsak til manglende signaler for angiotensin I ved så lave konsentrasjoner. Dette problemet ble ikke observert ved HPLC-analysene da konsentrasjonene som ble benyttet i disse analysene var mye høyere enn i LC-MS-analyse. Andelen av angiotensin I som forsvinner til glasset blir derfor liten i HPLC-analysene. Problemet med lave signaler på grunn av glassadsorpsjon kunne trolig vært unngått ved å benytte prøvebeholdere av et annet materiale, for eksempel plast. Dette ble imidlertid ikke forsøkt på grunn av at andre prøvebeholdere enn glass ikke var tilgjengelig på grunn av tidsnød. Tilsetning av HCl til peptidløsningen for å maskere silanolgruppene i glasset ble også forsøkt, uten resultat. Det ble derfor valgt å se bort fra angiotensin I på LC-MS, og isteden sette hovedfokus på angiotensin II som hele tiden gav stabile signaler i konsentrasjonsområdet. Angiotensin III gav tilfredsstillende signaler dersom peptidblandingen var nylaget.

6.2.3 Relativt standardavvik

Relativt standardavvik (RSD) ble beregnet av topphøydene etter HPLC-analyse av 3 prøver med peptider i vann analysert på samme dag (intra-day). RSD var 1,4 %, 4,5 % og 4,0 % for henholdsvis angiotensin I, II og III. RSD for retensjonstidene i analysene var under 0,3 % for alle peptidene.

Lave RSD for topphøydene og retensjonstidene vitner om at HPLC-metoden har god repeterbarhet. I bioanalyse med kompliserte matrikser kan RSD opp mot 10 % godtas [35]. Denne HPLC-metoden kan derfor også benyttes i analyse av angiotensiner i plasma.

Det ble også beregnet RSD for analyse av peptidløsninger på 4 ulike dager (inter-day). RSD var 9,0 %, 5,0 % og 12,1 % for henholdsvis angiotensin I, II og III. RSD for retensjonstidene i inter-day-analysene var lavere enn 0,8 % for samtlige peptider. Variasjonen i topphøyder ved analyse utført på ulike dager anses som uvesentlig i denne oppgaven, da topphøydene kun ble benyttet til beregning av utbytter som ble analysert samme dag.

RSD for LPME i vann ble beregnet på bakgrunn av analyse av 3 parallelle akseptorfaser. RSD lå i underkant av 10 %. Noe variasjon i disse forsøkene må forventes på bakgrunn av at ekstraksjonsoppsettet lages manuelt.

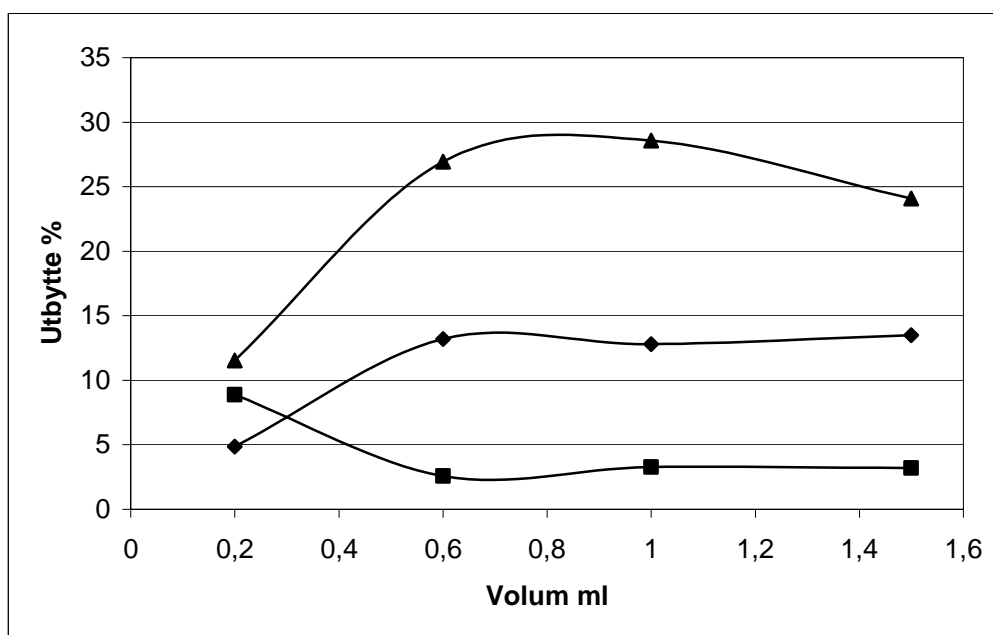
RSD for utbytte av LPME i plasma var større enn for LPME i vann, og lå mellom 10 og 25 %. Plasma er en komplisert matriks å utføre analyser i, og det må derfor forventes høyere RSD ved analyse av angiotensiner i plasma enn ved analyse i vann.

RSD for LC-MS-analysene ble ikke beregnet på grunn av tidsnød.

6.3 LPME i vann

6.3.1 Volum av donorfasen

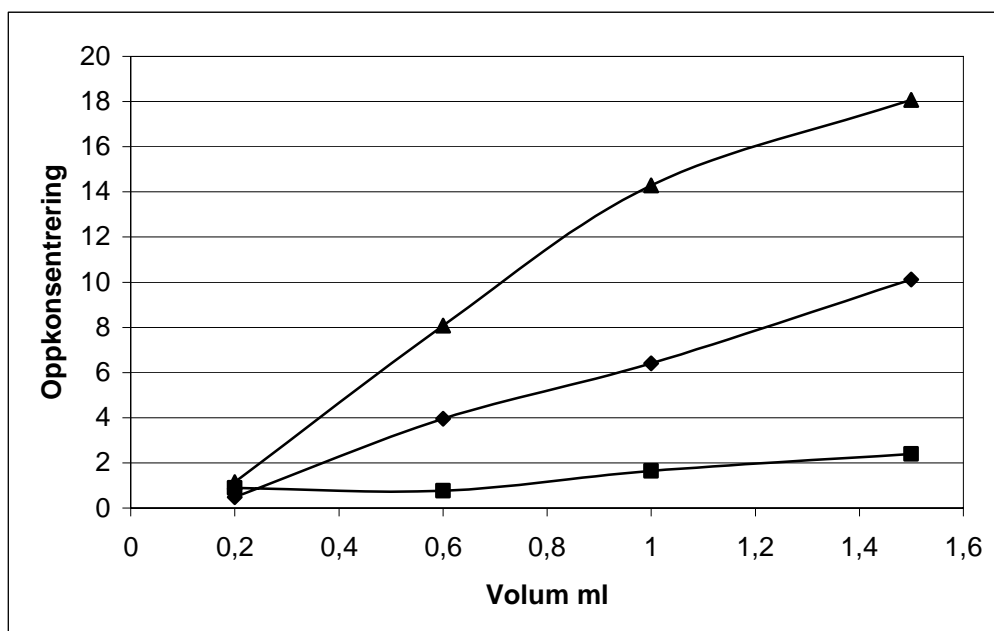
Det er tidligere vist at volumet av donorfasen spiller en rolle for ekstraksjonstiden i vann [43]. Ved mindre donorvolum får analyttene kortere vei å diffundere gjennom donorfasen og bort til hulfiberen. Dessuten er det en fordel med så lite donorvolum som mulig med tanke på prøveopparbeidelse av biologiske væsker, hvor tilgjengelig prøvevolum ofte er minimalt. Et lite donorvolum kan imidlertid være upraktisk å håndtere. Det ble derfor gjort forsøk med forskjellige donorvolum for å finne en balansegang mellom praktisk donorvolum og høyt utbytte. Oppkonsentrering i forhold til donorvolum ble også tatt hensyn til ved valg av donorvolum til det videre arbeidet.



Figur 6-7: Endring i donorvolum ved ekstraksjon av angiotensin I (♦), II (■) og III (▲), konstant pH i donorfase og akseptorfase

Figur 6-7 viser at utbyttet i LPME til en viss grad er avhengig av donorfases volum. Relativt lavt utbytte ved 0,2 ml prøvevolum kan som tidligere antydtes skyldes mekanisk svakhet i LPME-systemet. Ingen av resultatene fra donorvolumene på 0,6, 1,0 og 1,5 ml skiller seg vesentlig fra hverandre. Ekstraksjonene med alle donorvolumene ble utført i glassbeholdere bortsett fra 0,6 ml, som ble utført i eppendorfrør av plast. Som tidligere nevnt kan angiotensiner adsorberes på glass. Det er imidlertid usikkert om dette har noen betydning i

dette tilfellet da peptidkonsentrasjonene er relativt høye ($\mu\text{g/ml}$). Det kan derfor ikke trekkes noen endelig konklusjon om hvilket prøvevolum eller beholdermateriale som er best egnet.



Figur 6-8: Oppkonsentrering vs donorfasevolum ved LPME av angiotensin I (♦), II (■) og III (▲)

Muligheten for oppkonsentrering øker med større volum som vist i figur 6-8. Det store potensialet LPME har til oppkonsentrering er en av de store fordelene til denne ekstraksjonsmetoden sammenlignet med andre metoder for prøveopparbeidelse.

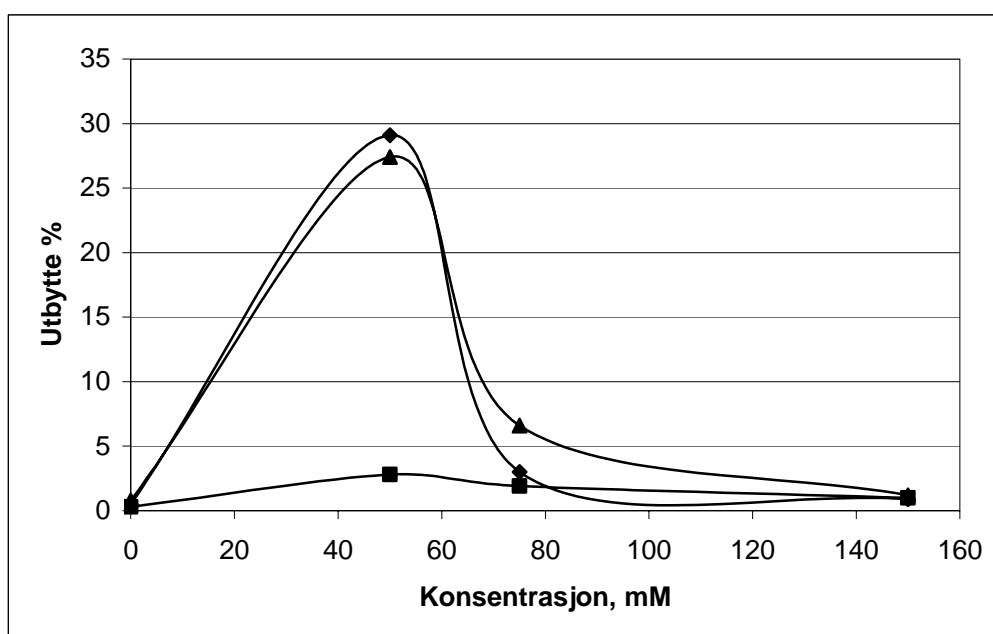
Med utgangspunkt i oppkonsentreringsmuligheter, utbytte og praktisk anvendelse ble 1 ml donorvolum i glassbeholdere foretrukket i det videre arbeidet. Muligheten for oppkonsentrering med dette donorvolumet er maksimalt 50 ganger dersom det benyttes 20 μl akseptorfase.

6.3.2 Ionpardanner

Variasjon i ionpardanner og dens konsentrasjon ble undersøkt i forhold til ekstraksjonsutbytte for angiotensin I-III.

6.3.2.1 1-heptansulfonsyre

Forsøk som er gjort tidligere med små modellpeptider viste at 1-heptansulfonsyre er en godt egnet ionpardanner for transport av små peptider over en organisk membran [21]. Denne syren ble derfor valgt som utgangspunkt i dette arbeidet. Det var imidlertid usikkert om en ionpardanner spilte like stor rolle i transporten av større peptider, og om effektiviteten av transporten var konsentrasjonsavhengig.



Figur 6-9: Variasjon i heptansulfonsyre konsentrasjon ved LPME av angiotensin I (♦), II (■) og III (▲), konstant pH i donorfase og akseptorfase

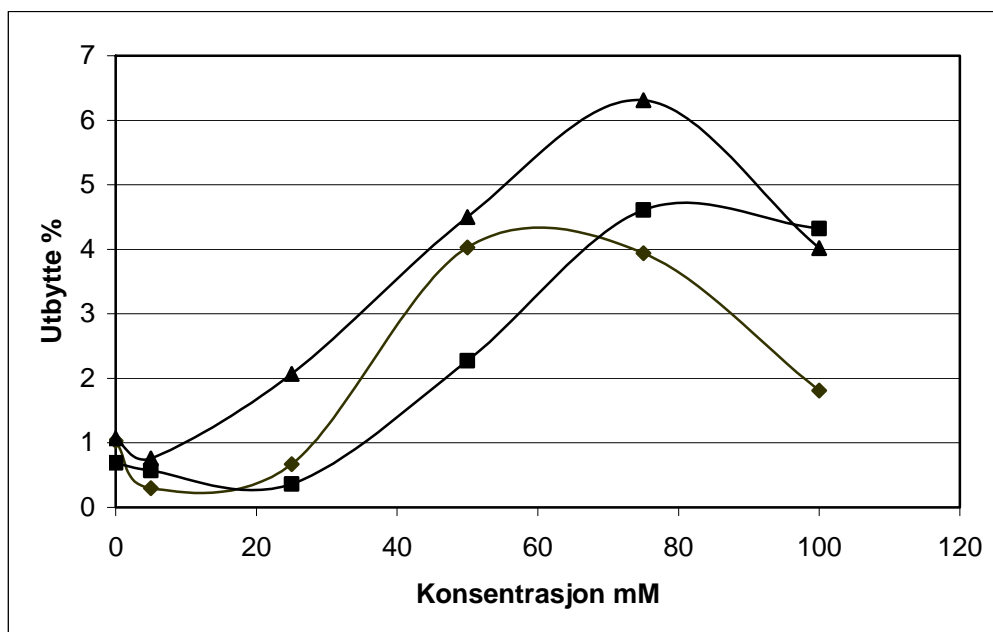
Som vist i figur 6-9 er transporten av angiotensiner over den organiske membranen sterkt avhengig av en ionpardanner. Det viste seg at under betingelsene som ble valgt, gav konsentrasjonen på 50mM 1-heptansulfonsyre maksimalt utbytte for alle angiotensinene. Angiotensin I og III har et klart optimum ved denne konsentrasjonen, og kurvene til disse to peptidene er nesten identiske. Kurven til angiotensin II er ganske flat, med lave utbytter ved alle heptansulfonsyre konsentrasjoner. Denne forskjellen mellom utbytte for angiotensin II i forhold til angiotensin I og III kan skyldes deres hydrofobisitet. Som diskutert i kapittel 4.2.3 er angiotensin II trolig mer hydrofilt enn de to andre peptidene. Komplekset som blir dannet

mellom angiotensin II og 1-heptansulfonsyre kan derfor være for hydrofilt til å vandre inn i den organiske fasen. Det er dessuten mulighet for at en kompleksdannelse mellom angiotensin II og 1-heptansulfonsyren ikke finner sted i like stor grad som mellom angiotensin I og III og 1-heptansulfonsyre. Ved $\text{pH} > 3,0$ har angiotensin II lavere netto positiv ladning enn de to andre peptidene (figur 4-4, s.14). Det er derfor færre tilgjengelige ladninger som syren kan bindes til, og kompleksdannelsen blir mer ufullstendig. Utbytte fra ekstraksjonen uten ionpardanner tilstede er tilnærmet 0 %. Dette bekrefter at peptidene må være tilstrekkelig hydrofobe for at en diffusjon over i organisk fase kan finne sted.

For høy konsentrasjon av ionpardanneren fremmer heller ikke ekstraksjonsutbytte for angiotensin I og III. En mulig forklaring på dette er at kompleksene blir for hydrofobe. De vil kunne diffundere inn i den organiske fasen, men være for hydrofobe til å kunne bli løsrevet fra den organiske fasen og over i akseptorfasen. Dette må bekreftes ved analyse av donorfasene i et eventuelt senere arbeid. Dessuten er det en sjanse for at angiotensinene felles ut ved nærvær av høye konsentrasjoner av heptansulfonsyre.

6.3.2.2 Dibutylfosfat

Dibutylfosfat (DBP) er ikke tidligere testet som ionpardanner i et LPME-system, og ble valgt på grunnlag av stoffets pK_a -verdi (1,53) og hydrofobisitet. I donorfasen, hvor pH er høyere enn 2, vil denne syren være negativt ladet. Den kan derfor danne komplekser med angiotensinene via ionparbindinger. Dersom pH i akseptorfasen er tilstrekkelig lav, vil DBP bli uladet i kontaktområdet mellom organisk fase og akseptorfasen. Dette betyr at den kan transporteres tilbake over den organiske membranen, og at den slipper peptidene lettere i akseptorfasen. DBP er imidlertid meget dårlig løselig i $\text{pH} < 4$ og ekstremt sur, selv i lave konsentrasjoner. Behovet for en buffer som kunne kontrollere pH var derfor tilstede. Det ble valgt en 100mM citratbuffer da denne viser å kunne holde en, for LPME, optimal pH. En løsning med 50mM DBP løste seg i en citratbuffer med $\text{pH} \sim 4,58$ slik at pH i sluttløsningen ble 3,87.



Figur 6-10: Variasjon i dBP-konsentrasjon ved LPME av angiotensin I (♦), II (■) og III (▲), konstant pH i donorfase og akseptorfase

Variasjon i dBP-konsentrasjon viser et optimum i forhold til utbytte (figur 6-10). Angiotensin II og III har et maksimalt utbytte ved 75mM dBP. Angiotensin I får like utbytter enten dBP-konsentrasjonen er 50 eller 75mM. Resultatene viser også her at transporten over den organiske fasen er betinget av ionpar-dannerkonsentrasjonen. Ekstraksjonen uten dBP tilstede gav små og utbetydelige utbytter. Angotensinene er derfor ikke hydrofobe nok i seg selv til å kunne diffundere over en organisk membran.

6.3.2.3 Sammenligning av 1-heptansulfonsyre og dBP

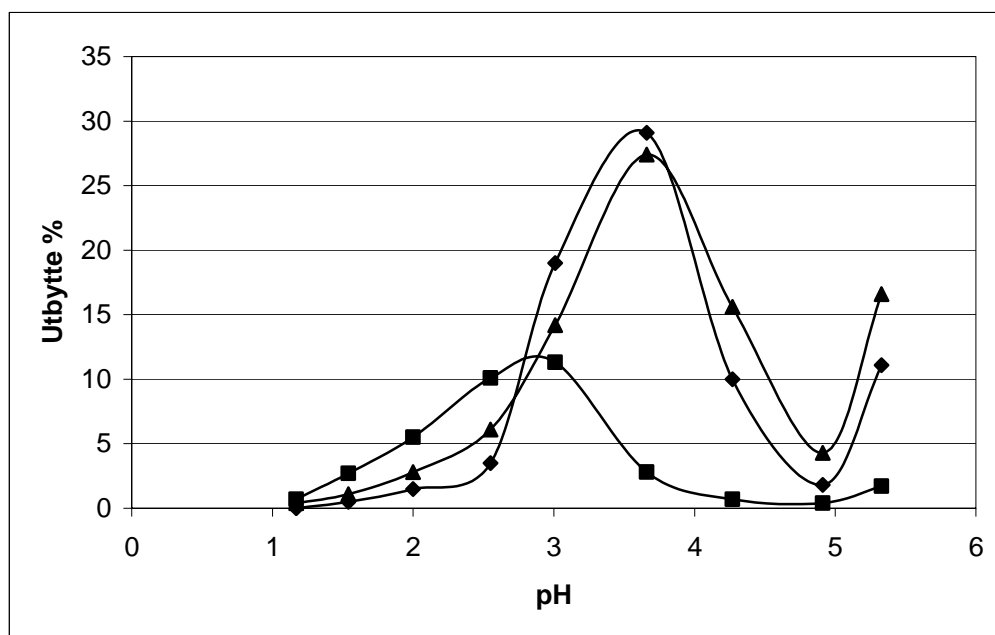
Forskjellen i utbytte mellom angiotensin I, II og III er ikke så stor med dBP som ionpardanner som med 1-heptansulfonsyre. Dette kan skyldes at dBP ikke har like stor evne til å danne hydrofobe komplekser med angiotensiner som 1-heptansulfonsyre, og at det derfor generelt blir lavere utbytter for alle angiotensinene. Det kan også være at kompleksene blir for hydrofobe, og at de av den grunn ikke kan løsrives fra den organiske fasen. Dessuten er det langt vanskeligere å ha god pH-kontroll når dBP benyttes som ionpardanner. På bakgrunn av den store forskjellen mellom 1-heptansulfonsyre og dibutylfosfat ble 1-heptansulfonsyre foretrukket i de resterende forsøkene med LPME.

6.3.3 Variasjoner i pH i donorfase

Transporten av angiotensiner over membranen er sterkt avhengig av pH i donorfasen. pH har stor betydning når det gjelder ladningen av analyttene og ionpardanneren slik at dannelse av hydrofobe komplekser fremmes.

6.3.3.1 Kontroll av pH med HCl

pH ble innledningsvis justert kun med saltsyre i forskjellige konsentrasjoner.



Figur 6-11: Utbytte av angiotensin I (♦), II (■) og III (▲) ved varierende pH i donorfase, konstant pH i akseptorfase

Figur 6-11 viser at alle angiotensinene i studien har sitt optimum for utbytte innenfor pH 3 - 4. En mulig forklaring på de lave utbyttene ved lav pH er ionpardannerkonsentrasjon. pH-avhengig fordelingskoeffisient mellom vannfase og organisk fase ($\log D$) for $C_7SO_3^-$ er ca -0,4 ved lav pH (~2). Dette betyr at fordelingen mellom $C_7SO_3^-$ (aq) og C_7SO_3H (org) vil være 10:4. Dermed synker den frie $C_7SO_3^-$ -konsentrasjonen i akseptorfase, og mindre ionpardanner er tilgjengelig for kompleksdannelse. Lavere $C_7SO_3^-$ -konsentrasjon fører til mindre utbytter i ekstraksjonsprosessen som vist i figur 6-9 (s.62). Ved høy pH i donorfasen blir komplekset med ionpardanner og peptid antakelig for hydrofilt til at det kan diffundere inn i den organiske fasen. Dette skyldes økt negativ ladning på angiotensinene ved høyere pH. Det er imidlertid tendenser til økte utbytter når pH stiger over 5. Det er vanskelig å ha god kontroll

på pH>4 ved bruk av HCl som eneste pH-regulerende middel. Dette er trolig en årsak til variasjonene i utbytte ved pH >4 som vist i figur 6-11. Det må imidlertid gjøres nærmere studier for å trekke noen endelig konklusjon om angiotensinenes vandring dersom pH nærmer seg det basiske området.

Angiotensin II skiller seg ut fra angiotensin I og III både når det gjelder hvilken pH den har sitt optimum ved, og når det gjelder prosent utbytte. Angiotensin II har optimalt utbytte ved pH~3, mens de to andre peptidene har sitt maksimum ved pH~3,7. Som tidligere nevnt har angiotensin II færre netto positive ladninger ved pH>3 enn angiotensin I og III. Ved pH~3,7, hvor disse to peptidene har sitt optimum, har dermed angiotensin II færre tilgjengelige positive ladninger til kompleksdannelse. Ved pH~3 har angiotensin II større positiv ladning og vil ha større evne til å danne hydrofobe komplekser med en ionpardanner. Dette komplekset vil trolig diffundere inn i den organiske fasen i mindre grad enn angiotensin I og III-kompleksene på grunn av den generelle polariteten til angiotensin II.

6.3.3.2 Kontroll av pH med ulike buffere

På bakgrunn av variasjonene i utbytte når pH>4 ble ulike buffere introdusert i donorfase. Acetat-, fosfat- og citratbuffer ble testet ut med tanke på å stabilisere pH. Acetatbuffer, pK_a 4,76, ble benyttet i pH-området mellom 3,8 og 5,7. Fosfatbufferen med pK_a 6,86 ble forsøkt i området mellom 5,8 og 7,8. Citratbufferen ble testet i pH-området mellom 2,5 og 5,0.

Tabell 6-5: Utbytte (%) ved bruk av ulike buffere i donorfase

	Citratbuffer						Acetatbuffer		Fosfatbuffer		
pH	2,76	3,23	3,84	4,07	4,55	5,04	3,95	4,89	5,78	6,81	7,77
Ang I	4,83	2,88	7,76	7,37	4,09	1,08	5,0	2,8	0,6	0,7	0,1
Ang II	12,37	6,56	4,1	3,36	0,85	0,32	1,6	0,2	0,5	0,2	0,0
Ang III	6,86	5,67	12	17,66	13,17	7,15	6,4	6,5	1,1	1,2	0,1

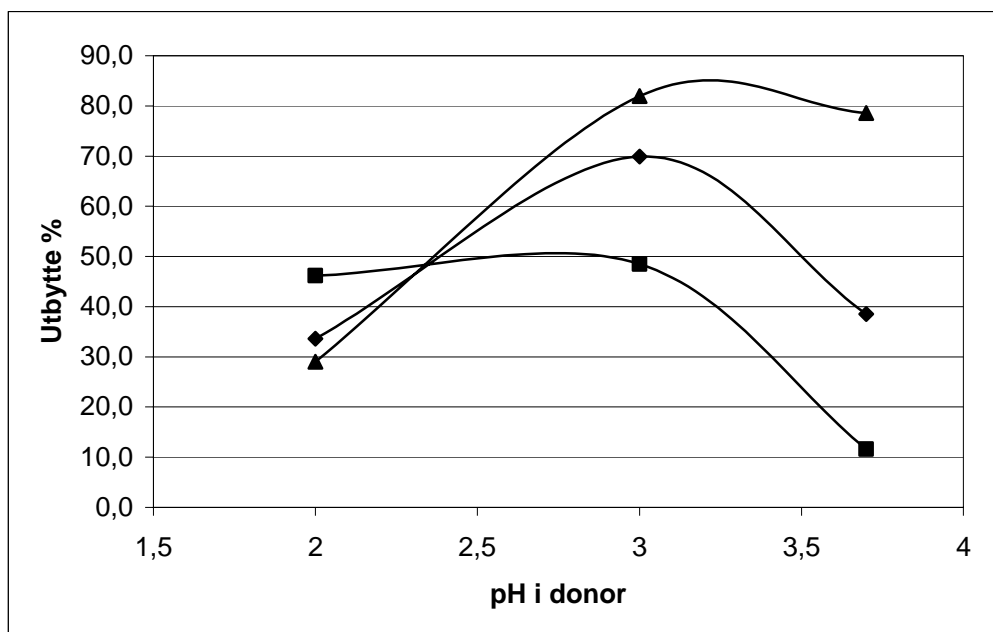
Resultatene som er angitt i tabell 6-5 viser også her at effekten av LPME er sterkt betinget av pH i donorfase. Fosfatbufferen med relativt høy pH i donorfase gav ubetydelige resultater og bekrefter ekstraksjonens pH-avhengighet. Denne bufferen ble derfor forkastet som fremtidig pH-regulerende faktor. Acetatbufferen gav heller ikke de resultater man kunne forvente ut fra tidligere forsøk med HCl. Dette kan skyldes at acetat vil konkurrere med

heptansulfonsyren som en ionpardanner, og at det derfor ikke blir dannet komplekser med angiotensinene som er hydrofobe nok til å diffundere over i den organiske fasen.

Citratbufferen var den eneste av de testede bufferene som gav resultater i nærheten av ekstraksjonene med HCl. Det ble like høyt utbytte av angiotensin II ved pH~3, uavhengig av om det var citratbuffer eller saltsyre som regulerte pH. Dessuten var utbytte likt ved pH~4 for angiotensin III. Siden dette peptidet hadde et klart maksimum ved lavere pH, var det likevel tydelig at HCl fungerte bedre som pH-regulator enn noen av bufferene. Saltsyre ble derfor foretrukket som pH-regulator i det videre arbeidet med LPME i vann.

6.3.4 pH i akseptorfase

Som tidligere nevnt har forholdet mellom pH i donor- og akseptorfase stor innvirkning på utbytte. Akseptorfase må være tilstrekkelig sur for at peptidene skal kunne løsrives fra komplekset med ionpardanneren. Akseptorfases pH ble derfor endret fra ~2 til ~1. Forsøkene i donorfasen viste at angiotensin II hadde sitt maksimale utbytte når pH var justert til ~3 med HCl i donorfasen. Angiotensin I og III ble best ekstrahert når saltsyre justerte pH til ca 3,7. pH-endring i akseptor skulle gjennomføres ved optimale forhold i donorfasen for hvert enkelt angiotensin. I tillegg ble det gjort ekstraksjoner med pH~2 i donorfasen for å få et mer helhetlig bilde av forholdet mellom pH i donorfase og akseptorfase. pH i akseptorfase ble endret fra ~2 til ~1 ved å benytte 0,1M HCl i stedet for 0,01M HCl. Som vist i figur 6-12 gav denne endringen mye høyere utbytte sammenlignet med tidligere forsøk med pH~2 i akseptorfase. Ved lav pH vil fordelingen mellom $C_7SO_3^-$ (aq) og C_7SO_3H (org) som tidligere nevnt være 10:4. Lav pH i akseptorfase fører til at den negativt ladede heptansulfonsyren lettere protoneres i kontaktområdet mellom organisk fase og akseptorfase. Dette gjør at peptidene slippes lettere fra komplekset og løses i akseptorfase.



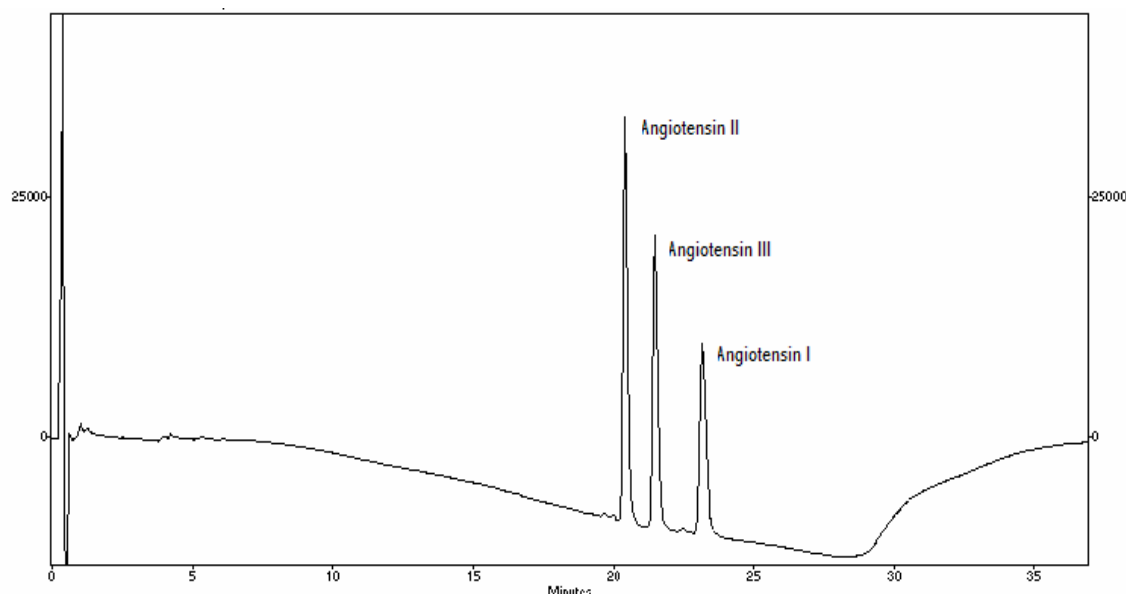
Figur 6-12: Utbytte av angiotensin I (♦), II (■) og III (▲) ved pH~1 i akseptorfase, varierende pH i donorfase

Figur 6-12 viser at alle angiotensinene blir optimalt ekstrahert ved pH~3 når pH i akseptor er 1. Her er sannsynligvis forholdet mellom H^+ -konsentrasjonen i donorfase og akseptorfase best; komplekset mellom peptid og ionpardanner er hydrofobt nok til å vandre inn i den organiske fasen samtidig som H^+ -konsentrasjonen er høy nok til å splitte dette komplekset i kontakt-området mellom organisk fase og akseptorfase.

Tabell 6-6: Oppkonsentrering (% utbytte) av angiotensiner, pH~1 i akseptor

pH i donor	2,0	3,0	3,7
Angiotensin I	16,8 (33,6 %)	35 (69,9 %)	19,3 (38,5 %)
Angiotensin II	23,1 (46,2 %)	24,2 (48,5 %)	5,8 (11,6 %)
Angiotensin III	14,5 (29,0 %)	41 (81,9 %)	39,3 (78,6 %)

Som det går frem av tabell 6-6 er muligheten for oppkonsentrering stor med denne LPME-metoden. Det er som tidligere nevnt teoretisk mulig å få en maksimal oppkonsentrering av analytten på 50 ganger. Under disse optimale forholdene i donorfase og akseptorfase ble det oppnådd en høy og god oppkonsentrering. Dette viser at ekstraksjonen skjer ved ionparmediert transport over membranen, og ikke bare ved passiv diffusjon. Dersom peptidene i akseptorfase kun var et resultat av en konsentrasjonslikevekt, hadde oppkonsentreringsfaktoren vært 1, og utbyttet ligget rundt 2 %.



Figur 6-13: Analyse av akseptorfase etter LPME

Figur 6-13 viser et eksempel på et kromatogram fra analyse av en akseptorfase etter LPME. Akseptorfase ble analysert på HPLC med gradienten som er vist i tabell 5-4 under optimale betingelser for LPME (pH~3 i donorfase, pH~1 i akseptorfase, *n*-oktanol som organisk fase).

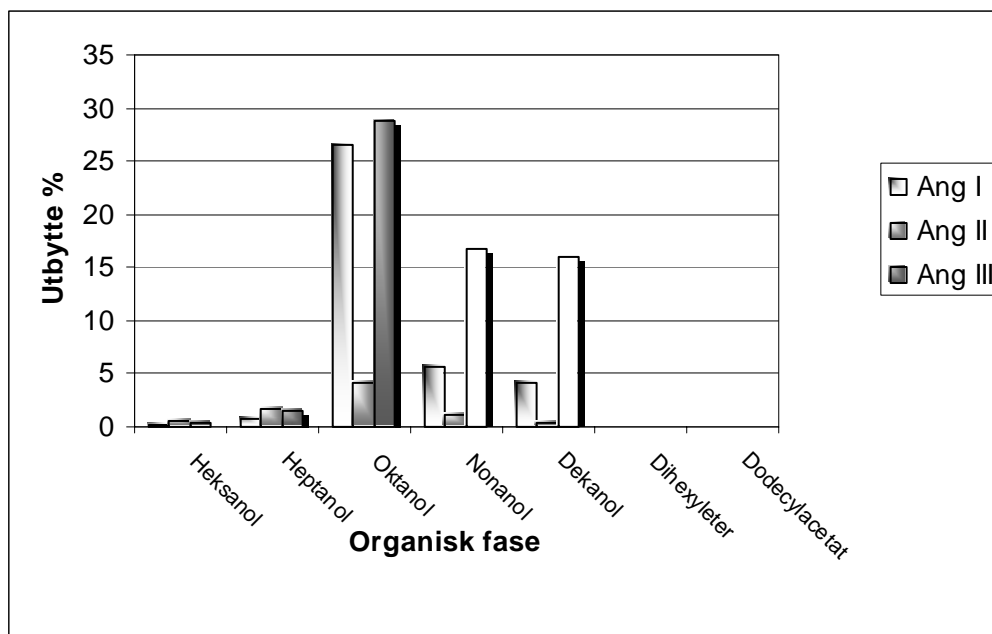
En del av donorfasene ble i dette forsøket analysert for å få et visst inntrykk av hvordan angiotensinene fordelte seg mellom donor-, organisk og akseptorfase. Resultatene i tabell 6-7 viser at angiotensin II hengte mest igjen i donorfase. Dette skyldes trolig at komplekset med angiotensin II og 1-heptansulfonsyre er mer hydrofilt enn kompleksene med ionpardanneren og angiotensin I og III. Angiotensin II-komplekset har dermed dårligere evne til å diffundere inn i den organiske fasen. Tabell 6-7 viser også at en større andel av peptidene diffunderte inn i organisk fase når pH i donorfase ble lavere. Den relativt høye andelen av peptider som var igjen i donorfase etter ekstraksjon med pH~3,7 er betinget av peptidenes mulighet for kompleks-dannelse. Ved pH~3,7 har peptidene mindre netto positiv ladning enn ved pH~3,0, og derfor færre seter med mulighet for å danne ionparbindinger med 1-heptansulfonsyre.

Tabell 6-7: Rest av peptider (%) i donorfase etter LPME

pH	3,0	3,7
Ang I	4,4	11,6
Ang II	36,0	67,4
Ang III	4,9	10,7

6.3.5 Organisk fase

Alkoholer med ulike kjedelengder (6-10 C-atomer) samt dihexyleter og dodecylacetat ble testet som organisk fase i LPME.



Figur 6-14: Ulike organiske faser ved LPME av angiotensin I, II og III

Figur 6-14 illustrerer resultater av utbytte fra LPME når fiberen ble impregnert med ulike organiske faser. Av de forskjellige organiske løsningsmidlene som ble testet, var det tydelig at *n*-oktanol klart gav det høyeste utbytte. Figur 6-14 viser at angiotensin I og III fikk et utbytte på mellom 25 og 30 % ved de benyttede ekstraksjonsbetingelsene (pH~3,7 i donorfase, pH~2 i akseptorfase). Utbytte for angiotensin II er under 5 % og skiller seg fra de to andre peptidene. Angiotensin III ble ekstrahert over membranen med nonanol og dekanol som organisk fase med over 15 % utbytte, mens utbytte for angiotensin I ligger rundt 5 %. Disse organiske fasene førte til skumdannelse og kraftig blakking av donorfasene. Dessuten var det tendenser til at også akseptorfasene ble blakket ved ekstraksjoner med nonanol og dekanol som organisk fase. Heksanol og heptanol gav små, ubetydelige utbytter når de ble benyttet som organisk fase i LPME. Dette skyldes trolig at de var for hydrofile til å sitte stabilt i membranen og til å kunne løse det hydrofobe komplekset mellom angiotensinene og ionpardanneren. Ekstraksjoner med dodecylacetat og dihexyleter som organisk fase gav ikke noe utbytte. Dette kan skyldes at peptidkompleksene ikke løses i disse fasene. Dodecylacetat og dihexyleter ble dermed ansett som uaktuelle som organiske faser i LPME av angiotensiner, både i vann og i plasma.

6.4 Plasma

6.4.1 Innledende forsøk

De optimale forholdene som ble funnet for ekstraksjon av angiotensiner i vann skulle overføres til plasma slik at LPME av angiotensiner kunne utføres i denne matriksen. Målet var å skape en 1 ml donorfase som bestod av plasma tilsatt angiotensin I, II og III, i tillegg til 50mM heptansulfonsyre og saltsyre som regulerte pH til ~ 3 . Dessuten skulle 0,1M HCl benyttes som akseptorfase, mens *n*-oktanol fortsatt ble sett på som den mest hensiktsmessige organiske fasen.

De innledende forsøkene som ble gjort for å gjenskape de optimale forholdene i donorfase indikerte at plasma vanskelig lar seg kombinere med ionpardanneren i surt miljø.

I den første testen av utfelling i plasma som er beskrevet i kapittel 5.6.1.1 var alle konsentrasjoner, bortsett fra 0,1M HCl, forlikelig med plasma. Ingen synlig utfelling fant sted ved de lavere konsentrasjonene av saltsyre. Men de lave konsentrasjonene av HCl ($\leq 0,01M$) var trolig ikke i stand til å bryte den kraftige bufferkapasiteten i plasma, og pH lå sannsynligvis fortsatt på $\sim 7,4$. For å oppnå ønsket pH ($\sim 3,0$) måtte 0,2M HCl tilsettes til plasma i et forhold på 6:10.

Det ble umiddelbar, kraftig utfelling dersom konsentrert heptansulfonsyre (600mM) ble satt til en løsning med pH-justert plasma ($\sim 3,0$). Det ble derfor gjort forsøk for å bestemme ved hvilken heptansulfonsyrekonsentrasjon det ble utfelling ved lav pH ($\sim 3,0$). En pH-justert plasmaprøve viste synlig utfelling når heptansulfonsyrekonsentrasjonen kom over 12,5mM. Om det først ble tilsatt ionpardanner til plasmaprøven, var pH $\sim 4,5$ den nedre grensen før prøven ble varig blakket.

Dersom plasma ble fortynnet med vann og justert til pH $\sim 3,5$, var det mulig å tilsette høyere konsentrasjoner av heptansulfonsyre (28mM) før den ble blakket. Det var imidlertid langt igjen til å nå målet om en konsentrasjon på 50mM. Det er dessuten en ulempe dersom plasma fortynnes når det gjelder eventuelle pasientprøver, siden den allerede lave konsentrasjonen av angiotensinene (10-60 pg/ml) også blir fortynnet.

På bakgrunn av de innledende forsøkene syntes det derfor umulig å kombinere sur plasma (pH~3) med heptansulfonsyre i tilstrekkelige mengder (50mM). Heptansulfonsyren vil trolig danne hydrofobe komplekser med plasmaproteinene, som felles ut når proteinene blir positivt ladet i surt miljø. Ionpardanneren vil på denne måten fungere som et proteinfellingsreagens, og det ble i det videre arbeidet derfor lagt vekt på å fjerne plasmaproteinene før pH-justering og tilsetning av ionpardanner.

6.4.2 Proteinfellingsreagenser

Triklorediksyre (TCA), sinksulfat og *m*-fosforsyre ble testet som potensielle proteinfellingsreagenser i plasma.

Tabell 6-8: pH-justering av supernatant til pH~3 etter proteinfelling med ulike fellingsreagenser

Fellingsreagens	Plasma: fellingsr.	pH i supernatant	Volum, supernatant	pH- regulator	Volum, pH- regulator	Slutt- pH
10 % TCA	2:1	1,0	2 ml	0,1M NaOH	1,6ml	3,0
10 % TCA	2:1	1,0	2 ml	1M NaOH	190µl	3,0
10 % sinksulfat, 0,5M NaOH	2:1	7,0	2 ml	1M HCl, 0,5M NaOH	90µl HCl, 133µl NaOH	3,0
5 % <i>m</i> -fosforsyre	1:1	2,5	2 ml	0,5M NaOH	450µl	3,0
5 % <i>m</i> -fosforsyre	2:1	3,5	2 ml	1M HCl	10µl	3,0

Tabell 6-8 gir en oversikt over proteinfelling med ulike fellingsreagenser og viser hvordan pH i supernatanten ble justert til ~3. Regulering med NaOH krevde relativt små volum for å få den ønskede pH, men det var svært vanskelig å ha god pH-kontroll. 1M NaOH fortynnet ikke plasma i like stor grad som 0,1M NaOH selv om det var mer problematisk å finjustere pH når konsentrert natriumhydroksid ble benyttet.

Felling med TCA gav meget klare og rene supernatanter fra plasma i forholdet plasma:syre 2:1. Supernatanten ble imidlertid meget sur, pH~1, uavhengig av forhold mellom TCA og plasma. Det var derfor nødvendig å justere pH supernatanten for å få optimal pH i donorfase. pH i supernatanten ble regulert med NaOH og HCl som vist i tabell 6-8.

Sinksulfat i kombinasjon med natriumhydroksid var mer krevende å jobbe med sammenlignet med TCA, da det var større variasjon i klarhet og renhet av supernatantene. I likhet med TCA var pH vanskelig å regulere også her, selv om pH i supernatanten var ~7. Finjustering måtte til for å oppnå pH~3.

Felling med *m*-fosforsyre gav også meget rene og klare supernatanter. Denne supernatanten ble mindre sur enn ved felling med TCA som vist i tabell 6-8. I tillegg hadde forholdet mellom plasma og fellingsreagens innvirkning på pH. Jo mindre mengder *m*-fosforsyre som ble brukt i forhold til plasma, jo høyere ble pH i supernatanten Dette viser at *m*-fosforsyre hadde mindre påvirkning av pH i plasma som TCA, selv om det også i dette tilfellet var vanskelig å kontrollere pH.

Tabell 6-9: Kontroll på pH av fellingsreagens med ulike buffere

Fellingsreagens	Volum fellingsreagens	Buffer	Volum buffer	pH i blandingen
10 % TCA	100µl	100mM acetatbuffer, pH~3,63	2 ml	1,98
10 % TCA	240µl	100mM acetatbuffer, pH~4,61	2 ml	1,61
10 % TCA	200µl	100mM fosfatbuffer, pH~4,5	2 ml	~2
10 % TCA	1,2ml	1M fosfatbuffer, pH~4,5	2 ml	~2
5 % <i>m</i> -fosforsyre	1,5 ml	100mM fosfatbuffer, pH~5	2 ml	1,94

Siden pH-styring i supernatanten med NaOH og HCl viste seg å være problematisk, ble ulike buffere testet med fellingsreagensene i vann med tanke på å få en mer pH-stabil donorfase. Det optimale i forhold til proteinfellingen ville være like mengder fellingsreagens og buffer, eventuelt større mengder fellingsreagens, slik at ikke løsningen med fellingsreagens ble fortynnet i for stor grad. Store mengder buffer ville også føre til unødvendig fortynning av plasma. Som det går frem av tabell 6-9, gav ingen av de testede bufferene tilfredsstillende resultater i vann. Selv store volum buffer i forhold til fellingsreagens var ikke i stand til å heve pH opp til ønsket nivå. Arbeidet med å finne en buffer med sterk nok kapasitet til å bufre supernatanten ble derfor avsluttet. Forsøkene ble imidlertid utført i vann. Dersom forsøkene hadde blitt utført i plasma, hadde resultatene muligens blitt bedre da plasma kunne bufret løsningen til en viss grad.

6.4.3 LPME i plasma

Det var utfra de innledende forsøkene med fellingsreagenser vanskelig å trekke noen endelig konklusjon om hvilket fellingsreagens som egner seg best i kombinasjon med LPME av angiotensiner i plasma. LPME ble derfor utført på supernatanter etter felling med alle reagensene.

Tilsetning av heptansulfonsyre til supernatanten etter proteinfelling gav ingen synlig utfelling, uavhengig av hvilket fellingsreagens som ble benyttet. Dette indikerer at plasmaproteinene danner uløselige komplekser med heptansulfonsyre i surt miljø og felles ut, som antydnet i kapittel 6.4.1. Angiotensinene ble tilsatt før eller etter proteinfelling i ulike prøver. Dette ble gjort for å studere effekten av proteinfelling på peptidene.

6.4.3.1 TCA

LPME ble utført i en supernatant etter proteinfelling med 10 % TCA som fellingsreagens i forholdet TCA:plasma 1:2. En løsning med 0,1M NaOH ble brukt som pH-regulerende faktor.

Tabell 6-10: Utbytte (%) fra LPME i plasma etter felling med 10 % TCA

	Peptid tilsatt før felling	Peptid tilsatt etter felling
Ang I	17,3	53,3
Ang II	22,4	37,0
Ang III	22,8	59,2

Resultatene i tabell 6-10 viser at en del av angiotensinene etter all sannsynlighet felles ut sammen med proteinene. Angiotensin II har mindre økning i utbytte ved tilsetning av peptid etter felling (65,2 % økning) enn angiotensin I (208,1 %) og angiotensin III (159,6 %). Dette viser at angiotensin II ikke felles ut i like stor grad, noe som muligens kan begrunnes i peptidets hydrofile egenskaper. Det er imidlertid uklart om TCA feller angiotensinene alene, eller om peptidene blir kapslet inn av kompleksene med protein og TCA og på denne måten blir dratt med i bunnfallet. Tilsetning av peptidblanding til supernatanten etter felling viste ingen synlig tegn til utfelling, dette kan tyde på at TCA ikke feller angiotensinene alene. Dette må imidlertid bekreftes ved senere forsøk. Uansett forårsaker felling med TCA et stort utbyttetap i LPME.

Man kan heller ikke se bort fra det faktum at angiotensin I som tilsettes plasma før felling kan metaboliseres til angiotensin II av angiotensin converting enzyme (ACE). Dette kan forklare hvorfor utbytte av angiotensin II er relativt større enn utbytte for de to andre peptidene tilsetning av peptid før felling. Mengden angiotensin II i plasma øker i forhold til den tilsatte mengden peptid, og det beregnede utbytte blir større. ACE kan dermed også være årsaken til at økningen i utbytte av angiotensin I er så stor ved tilsetning av peptid etter proteinfelling. ACE felles ut ved proteinfelling, og peptidene som tilsettes etter fellingen vil derfor ikke bli påvirket av dette enzymet. Angiotensin I metaboliseres ikke til angiotensin II, og forholdet mellom utbyttene for angiotensin I, II og III blir det samme som forholdet mellom utbyttene for LPME av de tre peptidene i vann under optimale betingelser.

6.4.3.2 Sinksulfat

Forsøkene med LPME i plasma etter proteinfelling med sinksulfat gav ingen utbytter. Årsaken til de dårlige resultatene kan være at sinkionene danner ionpar med heptansulfonsyre, og at det i praksis ikke er ionpardanner tilstede i donorfase. Dessuten var usikkerheten stor om hvorvidt sinksulfat ville forårsake utfelling av angiotensinene. Det ble derfor utført LPME-forsøk i vann med sinksulfat, ionpardanner og peptider som beskrevet i tabell 5-15 (s.43). I prøve 1 og 3 ble det dannet bunnfall når NaOH ble satt til løsningen med sinksulfat. Angiotensinene ble tilsatt før sentrifugering av prøve 1 og 2, mens de ble tilsatt etter sentrifugering og fjerning av eventuelt bunnfall i prøve 3 og 4. Resultatene i tabell 6-11 viser at angiotensinene trolig felles av sinksulfat da utbyttet i LPME ble større når peptidene ble tilsatt etter felling med sinksulfat (prøve 3) i forhold til før felling (prøve 1). Resultatene fra LPME av prøve 2 og 4 er nesten like. Sinksulfat er fraværende i disse prøvene, og det blir verken bunnfall med utfelling av peptider eller hemming av ionpardanner. Disse resultatene indikerer derfor at heptansulfonsyren blir inaktivert dersom sinksulfat er tilstede. På bakgrunn av disse forsøkene ble sinksulfat ansett som uaktuelt fellingsreagens i de videre studiene.

Tabell 6-11: Utbytte (%) i LPME etter forskjellige forsøk med sinksulfat i vann

	Prøve 1 (+Zn)	Prøve 2 (-Zn)	Prøve 3 (+Zn)	Prøve 4 (-Zn)
	Peptid før felling		Peptid etter felling	
Ang I	0,4	20,3	15,1	30,2
Ang II	6,2	38,7	23,7	42,1
Ang III	7,1	30,6	17,7	32,7

6.4.3.3 *m*-fosforsyre

LPME ble utført i en supernatant etter proteinfelling med 5 % *m*-fosforsyre som fellingsreagens i forholdet *m*-fosforsyre:plasma 1:2. En løsning med 0,1M NaOH ble brukt som pH-regulerende faktor.

Tilsetning av heptansulfonsyre til supernatanten etter felling med *m*-fosforsyre gav i enkelte tilfeller blakking av donorfasen. Dette kan tyde på at proteinfellingen ikke alltid skjer like fullstendig ved bruk av *m*-fosforsyre som fellingsreagens. Proteinene som ikke blir felt med *m*-fosforsyre felles derfor ut når ionpardanneren tilsettes.

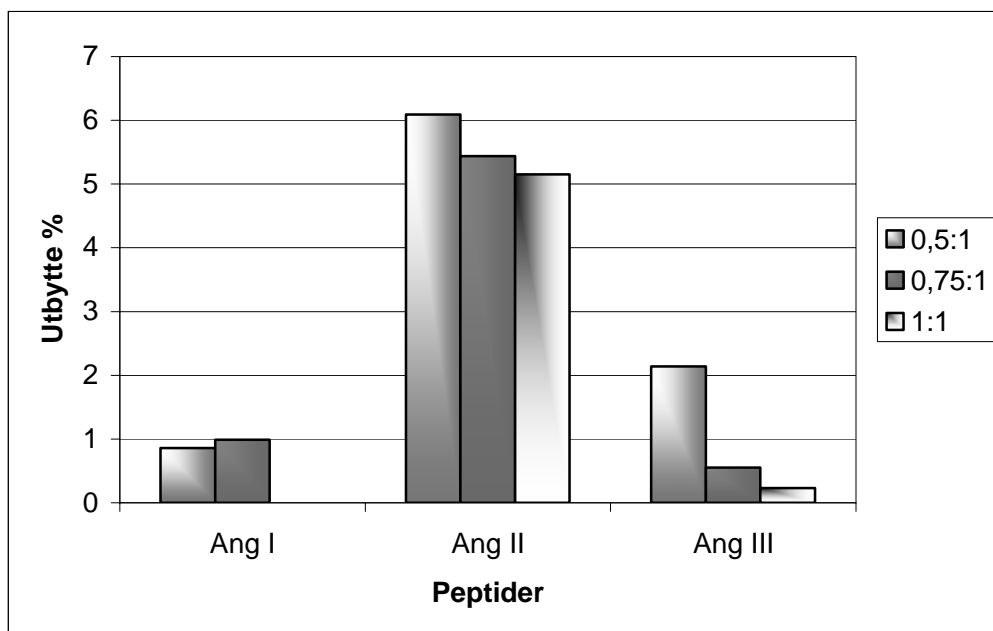
Tabell 6-12: Utbytte (%) fra LPME i plasma etter felling med 5 % *m*-fosforsyre

	Peptid tilsatt før felling	Peptid tilsatt etter felling
Ang I	7,5	23,4
Ang II	24,4	31,2
Ang III	6,1	17,5

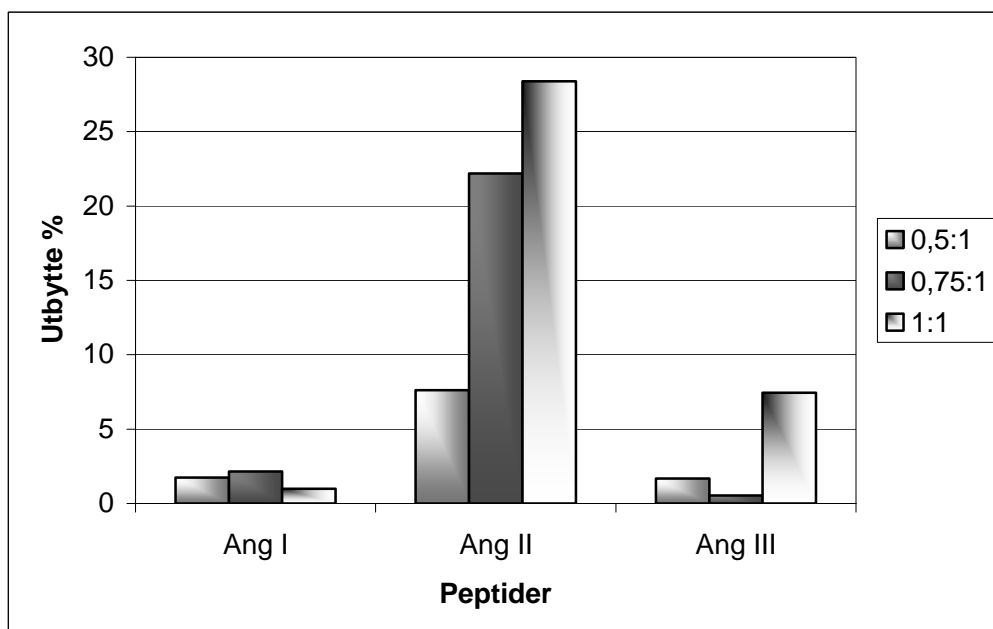
Tendensen til at angiotensinene til en viss grad felles ut i proteinfellingsprosessen er også tydelig når *m*-fosforsyre blir benyttet som fellingsreagens. Resultatene i tabell 6-12 viser at det er stor forskjell i utbytte ved tilsetning av peptider før og etter proteinfellingen. Endring i utbytte før og etter felling er 212 % for angiotensin I, 27,8 % når det gjelder angiotensin II, mens angiotensin III viser en forskjell på 186,9 %. Sammenlignet med utbytte etter felling med TCA ser det ut til at angiotensin II skiller seg fra de to andre peptidene. Angiotensin II lar seg i liten grad påvirke av proteinfellingen, og utbytte for dette peptidet er forholdsvis stabilt enten plasmaproteinene er felt med TCA eller *m*-fosforsyre. Dette kan igjen forklares med peptidenes forskjellige hydrofobisitet. Færre tilgjengelige positive ladninger på angiotensin II fører til mindre kompleksdannelse med proteinfellingsreagenset og lavere grad av utfelling. Dersom angiotensinene felles ut ved at de blir dratt med av komplekset med protein og syre, kan dette muligens skyldes hydrofobe interaksjoner mellom angiotensin og komplekset. Angiotensin II mer hydrofilt enn angiotensin I og III, og det dannes trolig derfor ikke hydrofobe interaksjoner med komplekset i like stor grad.

6.4.3.4 Forholdet mellom fellingsreagens og plasma

For TCA og *m*-fosforsyre har mengden fellingsreagens i forhold til plasma betydning for utbyttet. Det ble gjort forsøk med forhold fellingsreagens:plasma 0,5:1, 0,75:1 og 1:1 for begge fellingsreagensene.



Figur 6-15: Ulike forhold mellom TCA og plasma, tilsetning av peptid før felling



Figur 6-16: Ulike forhold mellom *m*-fosforsyre og plasma, tilsetning av peptid før felling

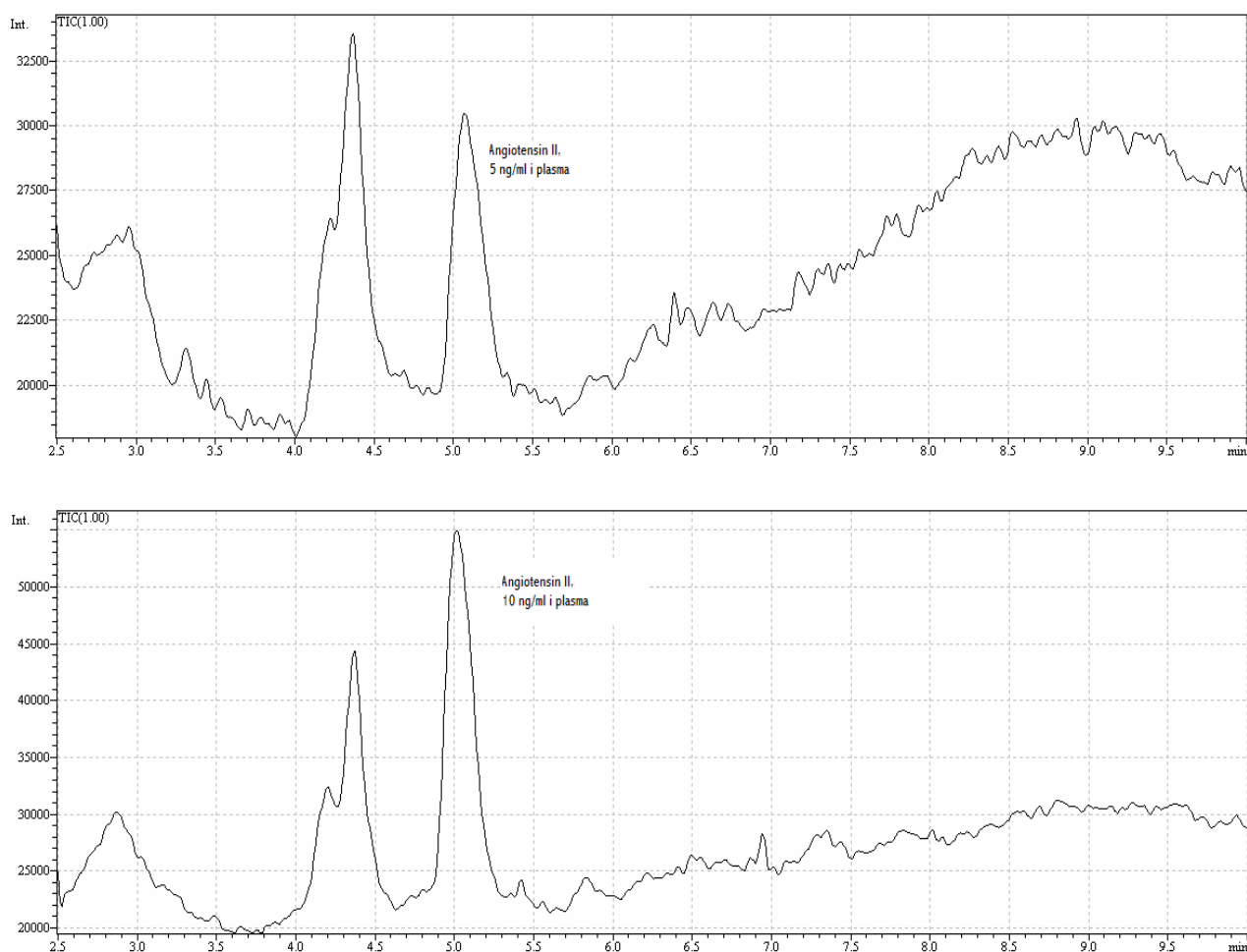
Dersom mengden av fellingsreagensen er for stor vil den tynne ut plasma unødvendig mye, samtidig som proteinfellingingen må være så fullstendig som mulig for å ikke forstyrre LPME-prosessen. Resultatene i figur 6-15 og 6-16 viser at forholdene som er benyttet tidligere i studien også er de mest optimale. Dersom TCA benyttes som fellingsreagens er 0,5 deler i forhold til 1 del plasma det mest gunstige, mens forholdet 1:1 gir best utbytte for *m*-fosforsyre. Plasma blir fortynnet i større grad i sistnevnte tilfelle, men krever til gjengjeld mindre tilsetning av NaOH når pH i supernatanten skal justeres. Det må påpekes at det i dette tilfellet er benyttet 1M NaOH som pH-regulator, og at utbyttet derfor er vesentlig lavere enn når pH justeres med 0,1M og 0,5M NaOH. En konsentrert supernatant gir med andre ord mer beskjedne utbytter enn når den tynnes ut med vandige løsninger. Dette kan skyldes viskositet i supernatanten. Dersom donorfasen er for viskøs, vil peptidene måtte vandre en lenger vei bort til den organiske fasen. En fullstendig ekstraksjon kan derfor ta lenger tid i en viskøs donorfase.

Også her observeres det relativt høyt utbytte av angiotensin II i forhold til angiotensin I og III. Peptidene er tilsatt før proteinfelling, og metabolisme av angiotensin I til angiotensin II har sannsynligvis funnet sted. Mengden angiotensin I som opprinnelig ble tilsatt er derfor mindre, mens angiotensin II-konsentrasjonen er høyere enn utgangspunktet.

6.4.4 LPME i plasma med LC-MS-analyse

Utbytte fra LPME i plasma skulle analyseres på LC-MS da denne detektoren er mye mer følsom enn hva tilfelle er for HPLC-UV. Dette er viktig i forhold til mulighetene for å kunne detektere endogent angiotensin.

Problemer med ustabile signaler fra dag til dag for angiotensin I og III ved de lave konsentrasjonene gjorde at fokus ble lagt på angiotensin II, som gav stabile signaler for alle konsentrasjoner gjennom hele prosessen. En videre utvikling av metoden må derfor også inkludere stabilitet av angiotensin I og III ved LC-MS-analyse. Det er tidligere vist at angiotensin adsorberes til glass [30], og sannsynligheten for at peptidene henger igjen i prøvebeholdere av glass som benyttes i LC-MS er derfor stor. Ved lave konsentrasjoner vil dette problemet forsterkes sammenlignet med høyere konsentrasjoner som ble benyttet ved HPLC.



Figur 6-17: Eksempler på LPME i plasma analysert med LC-MS

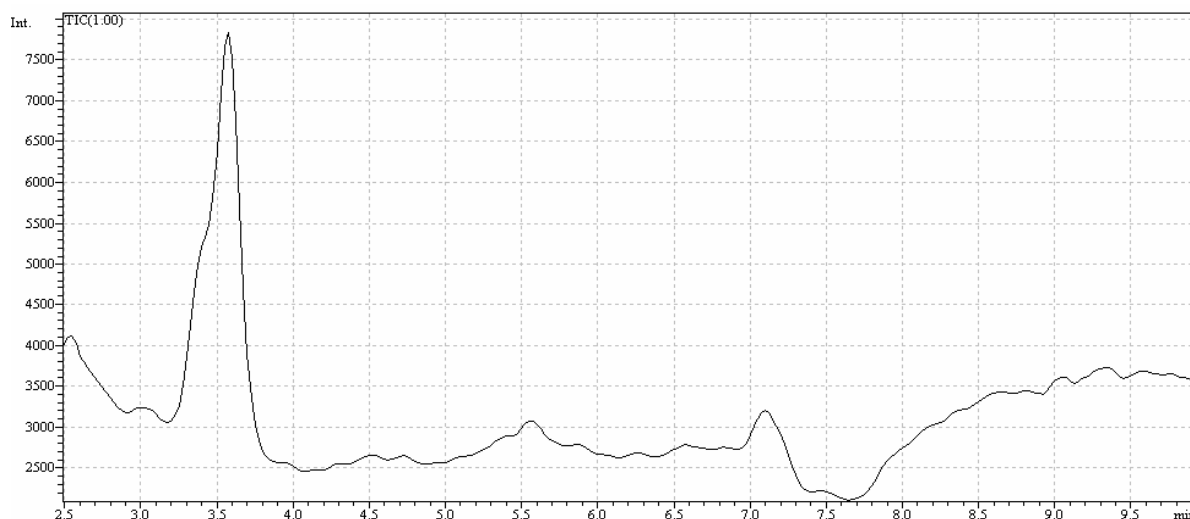
Hensikten med disse analysene var ikke først og fremst å beregne utbytte, men å bestemme hvor lave konsentrasjoner av peptider i plasma metoden var i stand til å detektere. Figur 6-17 viser at den laveste konsentrasjonen som ble testet (5 ng/ml i plasma) gav tydelige signaler på TIC-kromatogrammet (total ion current) for angiotensin II. De to andre peptidene lot seg ikke detektere ved de lave konsentrasjonene.

Tabell 6-13: Utbytte for angiotensin II fra LPME i plasma analysert med LC-MS

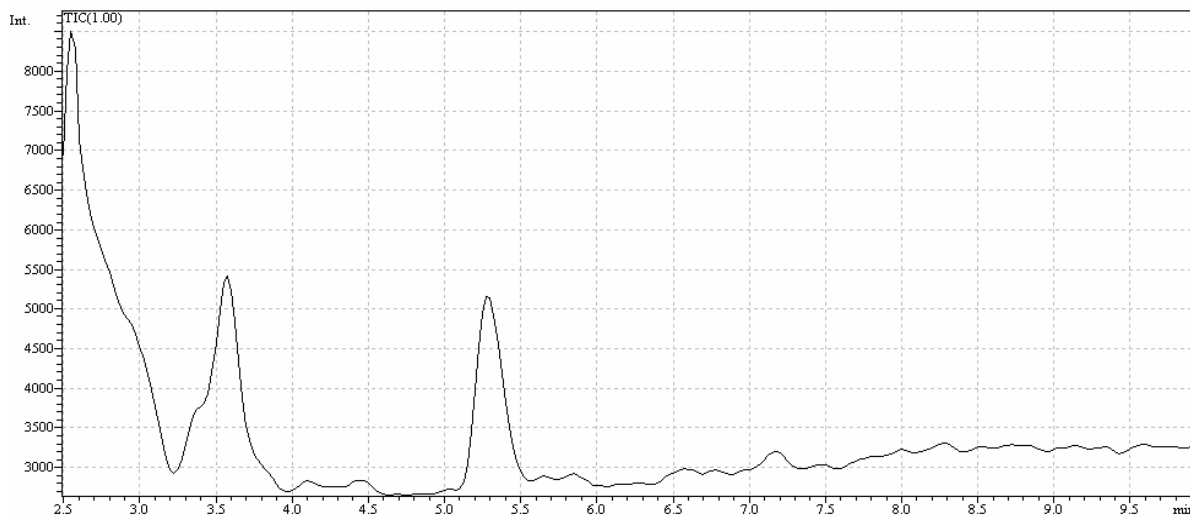
Konsentrasjon i plasma ng/ml	Utbytte %	Oppkonsentrering (fra plasma)
5	33,8	5,4
10	39,9	6,4
25	58,1	9,3
50	33,5	5,4

6.4.4.1 LPME i plasma med og uten ACE-hemmer

Som tidligere nevnt kan årsaken til relativt høye utbytter av angiotensin II etter LPME i plasma skyldes virkningen til ACE. Dersom dette enzymet hemmes før tilsetning av peptider, ville utbyttene muligens ikke bli så store. Figur 6-18 og 6-19 viser kromatogrammer fra analyse av akseptorfaser etter LPME med og uten ACE-hemmer (captopril) i plasma.



Figur 6-18: LPME i plasma med ACE-hemmer, peptidkonsentrasjon 50 ng/ml



Figur 6-19: LPME i plasma uten ACE-hemmer, peptidkonsentrasjon 50 ng/ml

Gjennomsnittlig topphøyde for masse/ladningsforhold 349,7 ved tilsetning av captopril var 635. Uten nærvær av ACE-hemmeren var gjennomsnittlig topphøyde 2333. Dette er en klar indikasjon på at forholdet mellom angiotensinene påvirkes av ACE dersom de tilsettes før proteinfelling. Dette får igjen betydning for forholdet mellom utbytte av de tre peptidene ved

LPME. Dette er også trolig årsaken til den relativt lave økningen i utbytte for angiotensin II ved tilsetning av peptid før og etter proteinfelling som beskrevet i 6.4.3.1 og 6.4.3.2.

6.4.4.2 Deteksjon av endogent angiotensin II

Resultatet av analyse av en akseptorfase etter LPME i blank plasma er vist i figur 6-20. Det er usikkert om toppen som ligger på 5,3 min er angiotensin II eller om det er en forurensning. Analyse av tre andre paralleller viste ingen signal ved denne retensjonstiden. Dette kan skyldes at angiotensin II-konsentrasjonen var lavere enn 50 pg/ml i plasma eller at oppkonsentreringen var dårligere enn 5 ganger. Dessuten kan signalene i LC-MS variere noe, slik at følsomheten blir lavere. Metoden som er utviklet kan derfor ennå ikke benyttes til deteksjon av endogent peptid. Dersom dette skal bli mulig, må metoden gjøres ytterligere følsom og oppkonsentrering fra plasma må bli bedre.



Figur 6-20: LPME i blank plasma

7 KONKLUSJON

Dette arbeidet har ført frem til en metode for å ekstrahere angiotensin I, II og III selektivt ut av humant plasma ved bruk av væskefasemikroekstraksjon. For å kunne nå dette målet ble metoden først optimalisert med vann som prøveløsning. Det ble oppnådd høye utbytter i vann (opp mot 90 %) og 40 ganger oppkonsentrering i de beste tilfellene. Det ble bekreftet at transporten over den organiske membranen er avhengig av et transportmolekyl, en ionpardanner som danner hydrofobe komplekser med peptidene. Overføring av metoden til plasma ble en utfordring da uforlikelighet mellom plasma og ionpardanner ved sur pH ble et problem. Denne vanskeligheten ble løst ved å foreta en proteinfelling før ekstraksjon med LPME. Utbytte ved ekstraksjon fra plasma lå mellom 17 og 23 % ved tilsetning av peptid før felling med TCA. Tilsetning av en ACE-hemmer til plasma førte til at utbytte for angiotensin II ble lavere enn uten denne hemmeren tilstede. Dette indikerer at ACE i plasma metaboliserer tilsatt angiotensin I til angiotensin II. Resultatet blir høyere utbytte av angiotensin II, og relativt lavere utbytte av angiotensin I og III.

Arbeidet har frembrakt dypere kunnskap om peptiders vandring mellom de tre fasene i LPME. Denne prøveopparbeidelsesteknikken i kombinasjon med HPLC-UV eller LC-MS har vist at den har stort potensial som analysekonsept for endogene peptider. Høy oppkonsentrering og effektiv prøveopprensning ved LPME gjør metoden velegnet til prøveopparbeidelse av analytter i lave konsentrasjoner.

Det ble også utviklet en HPLC-metode for fullstendig grunnlinjeseparering og analyse av angiotensin I, II og III på en C18-kolonne, samt en LC-MS-metode for analyse av peptidene etter deres masse/ladningsforhold. Problemer med stabile signaler for angiotensin I og III på LC-MS førte tilslutt til at analyse av angiotensin II ble vektlagt i dette arbeidet.

Videre muligheter for forbedring av denne metoden vil være å optimalisere forholdene i plasma slik at prøveopparbeidelsen kan bli enklere og utbytte bli like høyt som i vann. Metoden må dessuten standardiseres og valideres i henhold til retningslinjer fra International Conference of Harmony (ICH) før det kan trekkes noen endelig konklusjon om dette er en velegnet metode for selektiv prøveopparbeidelse av angiotensin I, II og III. Oppgaven danner imidlertid et godt grunnlag for fremtidige studier av peptiders vandring i et LPME-system.

8 REFERANSELISTE

1. Lundell N, Schreitmuller T: *Sample preparation for peptide mapping - A pharmaceutical quality-control perspective*. Analytical Biochemistry 1999, **266**(1):31-47.
2. Causon RC, McDowall RD: *Sample Pretreatment Techniques for the Bioanalysis of Peptides*. Journal of Controlled Release 1992, **21**(1-3):37-48.
3. Herraiz T, Casal V: *Evaluation of Solid-Phase Extraction Procedures in Peptide Analysis*. Journal of Chromatography A 1995, **708**(2):209-221.
4. Drapala A, Dzygiel P, Jonsson JA, Wieczorek P: *Supported liquid membrane extraction of peptides*. Acta Biochimica Polonica 2001, **48**(4):1113-1116.
5. Drapala A, Wieczorek P: *Extraction of short peptides using supported liquid membranes*. Desalination 2002, **148**(1-3):235-239.
6. Dzygiel P, Wieczorek P: *Extraction of glyphosate by a supported liquid membrane technique*. Journal of Chromatography A 2000, **889**(1-2):93-98.
7. Buschmann HJ, Mutihac L: *Complexation, liquid-liquid extraction, and transport through a liquid membrane of protonated peptides using crown ethers*. Analytica Chimica Acta 2002, **466**(1):101-108.
8. Buschmann HJ, Mutihac L, Mutihac R: *Physicochemical parameters of the transport of amines and amino acids through liquid membranes by macrocyclic ligands*. Separation Science and Technology 1999, **34**(2):331-341.
9. Mutihac L, Buschmann HJ, Jansen K, Wego A: *Interactions and transport through liquid membranes of some dipeptide complexes with macrocyclic receptors*. Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems 2001, **18**(1-2):259-264.
10. Juang RS, Wang YY: *Amino acid separation with D2EHPA by solvent extraction and liquid surfactant membranes*. Journal of Membrane Science 2002, **207**(2):241-252.
11. Choi JW, Cho KS, Oh BK, Kim YK, Youn IJ, Lee WH: *Separation and concentration of L-phenylalanine using hollow fiber supported liquid membrane*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 2003, **9**(3):294-300.
12. Calzado JA, Palet C, Valiente M: *Facilitated transport and separation of aromatic amino acids through activated composite membranes*. Analytica Chimica Acta 2001, **431**(1):59-67.

13. Liu XR, Liu DS: *Modeling of facilitated transport of phenylalanine by emulsion liquid membranes with di(2-ethylhexyl)phosphoric acid as a carrier*. Separation Science and Technology 1998, **33**(16):2597-2608.
14. Oshima T, Inoue K, Furusaki S, Goto M: *Liquid membrane transport of amino acids by a calix 6 arene carboxylic acid derivative*. Journal of Membrane Science 2003, **217**(1-2):87-97.
15. Ersoz M, Vural US, Okdan A, Pehlivan E, Yildiz S: *Transport Studies of Amino-Acids through a Liquid Membrane System Containing Carboxylated Poly(Styrene) Carrier*. Journal of Membrane Science 1995, **104**(3):263-269.
16. Metayer M, Legras M, Grigorchouk O, Nikonenko V, Langevin D, Labbe M, Lebrun L, Shaposhnik V: *Facilitated transport of alpha-alanine and phenylalanine through sulfonic cation-exchange membranes*. Desalination 2002, **147**(1-3):375-380.
17. Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Reubsaet JLE, Rasmussen KE: *Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples*. Journal of Separation Science 2003, **26**(17):1520-1526.
18. Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Reubsaet JLE, Rasmussen KE: *Liquid-phase microextraction combined with flow-injection tandem mass spectrometry - Rapid screening of amphetamines from biological matrices*. Journal of Separation Science 2001, **24**(7):615-622.
19. Andersen S, Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Tanum L, Refsum H: *Stereospecific determination of citalopram and desmethylecitalopram by capillary electrophoresis and liquid-phase microextraction*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2003, **33**(2):263-273.
20. Ugland HG, Krogh M, Reubsaet L: *Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood*. Journal of Chromatography B 2003, **798**(1):127-135.
21. Paulsen JV: *Væske-fase mikroekstraksjon av små modellpeptider i surt miljø*. 2003.
22. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: *Principles of Biochemistry*, 2 edn; 1992.
23. Sayeski PP, Ali MS, Semeniuk DJ, Doan TN, Bernstein KE: *Angiotensin II signal transduction pathways I*. Regulatory Peptides 1998, **78**(1-3):19-29.
24. Tietz NW, Pruden EL, McPherson RA, Fuhrman SA: *Clinical guide to laboratory tests*. Philadelphia; 1995.
25. Rang HP, Dale MM, Ritter JM: *Pharmacology*; 1999.

26. Huggins CE, Domenighetti AA, Pedrazzini T, Pepe S, Delbridge LM: *Elevated intracardiac antiotensin II leads to cardiac hypertrophy and mechanical dysfunction in normotensive mice*. Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System 2003, **4**(3):186-190.
27. Hansch C, Leo A, Hoekman D: *Exploring QSAR Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*; 1995.
28. Lacher NA, Garrison KE, Lunte SM: *Separation and detection of angiotensin peptides by Cu(II) complexation and capillary electrophoresis with UV and electrochemical detection*. Electrophoresis 2002, **23**(11):1577-1584.
29. Kajiro T, Nakajima Y, Fukushima T, Imai K: *A method to evaluate the renin-angiotensin system in rat renal cortex using a microdialysis technique combined with HPLC fluorescence detection*. Analytical Chemistry 2002, **74**(17):4519-4525.
30. Walles M, Mullett WM, Pawliszyn J: *Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2004, **1025**(1):85-92.
31. Matsui T, Tamaya K, Kawasaki T, Osajima Y: *Determination of angiotensin metabolites in human plasma by fluorimetric high-performance liquid chromatography using a heart-cut column-switching technique*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 1999, **729**(1-2):89-95.
32. Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S: *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2004, **23**(1):1-10.
33. Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Krogh M, Ugland HG, Gronhaug T: *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A 2000, **873**(1):3-11.
34. Reubsaet JLE: *Use of LC-MS in Bio-analysis of Pharmaceuticals and Macromolecules*; 2003.
35. Rasmussen KE: *Bioanalyse og validering av analysemetoder*; 2002.
36. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R: *Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2003, **785**(2):263-275.

-
37. Ho TS, Halvorsen TG, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE: *Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport*. Journal of Chromatography A 2003, **998**(1-2):61-72.
 38. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE: *Kromatografi*; 1998.
 39. Yi EC, Lee H, Aebersold R, Goodlett DR: *A microcapillary trap cartridge-microcapillary high-performance liquid chromatography electrospray ionization emitter device capable of peptide tandem mass spectrometry at the attomole level on an ion trap mass spectrometer with automated routine operation*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2003, **17**(18):2093-2098.
 40. Savant IA, Kalis M, Almoazen H, Ortiz SR, AbuTarif M, Taft DR: *Alternative high-performance liquid chromatographic assay for p-aminohippuric acid (PAH): effect of aging on PAH excretion in the isolated perfused rat kidney*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2001, **26**(5-6):687-699.
 41. Aylward G, Findlay T: *SI Chemical Data*, 4 edn; 1998.
 42. Iscan YY, Capan Y, Senel S, Sahin MF, Kes S, Duchane D, Hincal AA: *Formulation and in vitro in vivo evaluation of buccal bioadhesive captopril tablets*. Stp Pharma Sciences 1998, **8**(6):357-363.
 43. Ho TS, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE: *Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions*. Analyst 2002, **127**(5):608-613.